

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
A.O. 5995

THÈSE DE DOCTORAT D'ÉTAT ÈS-SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS VI

par

Madame Nicole DUMAS

pour obtenir
le grade de Docteur ès-Sciences

RECHERCHES SUR LA CONSERVATION DE TOXOPLASMA GONDII AUX BASSES TEMPÉRATURES ACTION DU DIMÉTHYL-SULFOXYDE

Soutenue le : 7 juillet 1971

devant la Commission d'Examen
MM. J.-A. THOMAS, *Président*.
A. HOLLANDE, *Examineur*.
Cl. ROZE, *Examineur*.
P. GIROUD, *Rapporteur*.



A mon Maître, le docteur P. Giroud, chef de service honoraire à l'Institut Pasteur de Paris, membre de l'Académie de Médecine. Il m'a enseigné le « métier de chercheur » et transmis son enthousiasme. Il m'a guidée avec bonté et conseillée avec compétence. Je lui exprime ma profonde gratitude.

Au docteur J.-A. Thomas, professeur de Physiologie cellulaire à l'Université Paris-VI, membre de l'Académie des Sciences, qui m'a inspiré le sujet de cette thèse, m'a fait l'honneur de la présider et m'a conseillée avec sollicitude. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Je remercie :

Le professeur A. Hollande (Laboratoire d'Evolution des Etres organisés - Paris) : il m'a toujours accueillie avec bienveillance dans son laboratoire et m'a initiée à la microscopie électronique.

Le professeur J.-B. Jadin (Institut de Médecine tropicale - Anvers) et le docteur J.-M. Jadin, son fils : leur amitié m'a été précieuse et, grâce à eux, j'ai pu achever à Louvain l'étude en microscopie électronique de cette thèse.

Tous ceux qui ont contribué à ma carrière pastorienne et, particulièrement, le regretté professeur M. Baltazard, le professeur J. Levaditi, le professeur M. Piéchaud et Madame le docteur Piéchaud.

Tous les Collaborateurs du Service des Rickettsioses qui m'ont aidée pour ce travail et m'ont encouragée par leur sympathie, ainsi que Monsieur J. Grzelak, auteur des photomicrographies.

Je dédie ce travail à la mémoire de mon père, je l'offre à mes enfants Hélène, Jacques, François.

Que ma mère trouve ici la récompense de son dévouement, mon mari, de sa compréhension.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549016_0054

ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Tome 49

1974

N° 1

Annales de Parasitologie (Paris), 1974, t. 49, n° 1, pp. 1 à 40

MÉMOIRES ORIGINAUX

Conservation aux basses températures *de Toxoplasma gondii* Nicolle et Manceaux, 1909

Action du diméthyl-sulfoxyde (1)

par N. DUMAS

Institut Pasteur, Laboratoire des Rickettsioses

28, rue du Docteur-Roux, B.P. 520, F 75724 Paris Cedex 15

La toxoplasmose a vu son importance s'accroître au cours de ces dernières années tant en pathologie humaine qu'en pathologie animale. Si la découverte des formes sexuées des toxoplasmes vient de permettre de préciser sa position systématique, il n'en reste pas moins que seule la forme végétative est pathogène. Cette forme végétative, très fragile, ne se multipliant qu'au sein de cellules vivantes pose aux laboratoires un problème de conservation : notre but fut de trouver la solution la meilleure et la plus simple (1).

Dans un premier temps, nous avons déterminé, en fonction des divers facteurs, les conditions d'une bonne conservation. Nous avons ensuite observé les effets cytologiques des diverses modalités de conservation par congélation. Enfin nous avons contrôlé l'absence de transformations antigéniques décelables par les réactions de diagnostics sérologiques courantes lors de conservations prolongées aux conditions déterminées préalablement.

The importance of *Toxoplasma* has increased over the past few years as much in human pathology as in animal pathology. If the discovery of sex forms of *Toxoplasma* has recently enabled it to be accurately classified nevertheless only the proliferative form is pathogenic. This proliferative form which is very fragile and which can reproduce

only inside living cells, presents laboratories with the problem of its preservation ; our aim has been to find the best and easiest method (1).

First we established, in the presence of various factors, those conditions giving good preservation. Then we observed the cytological effects of different methods of preservation by freezing. Finally we have verified the absence of antigenic transformations detectable by the reactions of current serological diagnoses, during prolonged preservation under predetermined conditions.

I. DETERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES DE CONSERVATION DE *TOXOPLASMA GONDII* AUX BASSES TEMPERATURES. ACTION DES SUBSTANCES PROTECTRICES

Résumé

Pour la conservation de *Toxoplasma gondii* aux basses températures, les meilleurs résultats furent obtenus avec de l'exsudat péritonéal de souris infectées, dilué au 1/10 en eau physiologique, auquel on ajoute 5 ou mieux 10 p. 100 du diméthyl-sulfoxyde : cet exsudat est congelé lentement jusqu'à -79°C , conservé à cette température et décongelé rapidement à 37°C .

Le diméthyl-sulfoxyde n'est pas dénué de toxicité pour les toxoplasmes, ce qui empêche d'utiliser ce produit à des doses supérieures à 10 p. 100, mais à cette dose il est moins toxique que la glycérine et doué d'un meilleur pouvoir protecteur.

Dans les conditions définies ci-dessus, de bonnes conservations ont été réalisées avec les différentes souches, sans modifications de caractères biologiques et pendant des temps pouvant aller jusqu'à plusieurs années.

Cette méthode est applicable aux toxoplasmes se multipliant sur des cellules en culture, moyennant quelques adaptations techniques.

Summary

Preservation of Toxoplasma gondii at low temperatures. Effect of dimethyl-sulfoxide.

To preserve *Toxoplasma gondii* at low temperatures, the best results were obtained with peritoneal exudate from infected mice, diluted to 1/10 in saline solution to which is added 5 % or preferably 10 % dimethyl-sulfoxide (DMSO) ; this exudate was slowly frozen down to -79°C , maintained at this temperature, and quickly unfrozen to 37°C .

(1) Cette étude a fait l'objet d'une thèse de Doctorat d'Etat ès-Sciences Naturelles, présentée sous le titre « Recherches sur la Conservation de *Toxoplasma gondii* aux basses températures. Action du Diméthyl-Sulfoxyde » et soutenue le 7 juillet 1971 à l'Université de Paris VI. Le texte complet est déposé au C.N.R.S. sous le n° A.O. 5995. Le travail a été exécuté sous la direction de M. le Professeur J.-A. Thomas, Laboratoire de Biologie et de Physiologie cellulaire de la Faculté des Sciences, Paris VI et de M. le Professeur P. Giroud, Laboratoire des Rickettsioses, Institut Pasteur, Paris.

Since dimethyl-sulfoxide is not free of toxicity for *Toxoplasma*, it cannot be used at concentration greater than 10 %, but at this concentration it is less toxic than glycerol and has a better protective power.

In the conditions defined above, good preservation was obtained with the different strains, with no change of biological characteristics and during periods capable of extending over several years.

This method, with some adaptations of the technique, can be applied to *Toxoplasma* growing in cell cultures.

Introduction

Depuis longtemps la conservation de la vie préoccupe les chercheurs et l'obtention par les physiiciens de froids de plus en plus poussés a ouvert aux biologistes d'immenses possibilités.

Dès 1776, l'Abbé Lazare Spallanzani, célèbre biologiste de Paris, publiait ses Opuscules de physique animale et végétale où il avait rassemblé les résultats d'expériences tendant à combattre l'opinion de Buffon qui croyait à la génération spontanée. Il avait fait entre autres des essais sur l'influence de diverses températures sur « des vers spermatiques » et écrivait à ce propos « ... je m'aperçus alors que le froid ne les avait pas tués, mais seulement réduits à un état d'une entière inertie ».

La possibilité de conservation, grâce au froid devait continuer à hanter les esprits, puisqu'en 1843, John Hunter, ancien médecin de la Marine, qui peut être considéré comme le fondateur de la pathologie expérimentale en Angleterre, allait jusqu'à espérer prolonger la vie d'un homme par ce procédé en le décongelant tous les cent ans. Quelques années plus tard, il reconnaissait l'utopie de son idée et avouait plaisamment qu'il avait pensé faire ainsi fortune...

Plus sérieusement Milne-Edwards, un des fondateurs de la physiologie française disait en 1857 : « On sait également bien que la congélation n'est pas toujours une cause de mort dans les tissus qui en sont frappés... ».

A ce propos, on assista à la fin du siècle dernier, entre Pouchet et Pictet, à une plaisante controverse scientifique ayant pour objet l'action du froid et la conservation de la vie. La croyance populaire prétendait que les poissons peuvent, sans mourir, être gelés au point de devenir cassants : Pouchet s'y opposait et Pictet s'y ralliait, apportant l'un et l'autre des expériences à l'appui de leurs convictions. La survie des poissons dépend des conditions de congélation, ce qui devait être précisé par Britton en 1924, puis Veigmann en 1936 et Luyet en 1938.

Entre temps d'autres expériences mettant en jeu, froid et vie, avaient eu lieu.

Becquerel, dès 1909 par une série d'expériences remarquables, démontrait la conservation de divers matériels grâce à des froids allant jusqu'aux confins du zéro absolu. Ces températures permettant « la suspension momentanée de la vie » ou mise en « vie latente » semblaient conserver intact le potentiel vital des éléments. Mais Becquerel expérimentait essentiellement sur des graines, des spores de champignons ou des bactéries qui sont déjà particulièrement résistantes dans la nature. Le problème pour

les biologistes était de conserver des cellules de structures complexes et fragiles. Luyet, à partir de 1937, étudia le phénomène de la congélation et en donna plusieurs explications qui permirent d'améliorer les techniques de conservation par le froid : congeler le plus rapidement possible le matériel vivant et procéder à un dégel instantané. Ces conditions étaient souvent difficilement réalisables et, de toutes façons, donnaient de gros déchets, certains tissus ne supportant pas ces traitements. Cependant, Luyet put réanimer, entre autres, des anguillules et des spermatozoïdes après les avoir congelés à -196°C .

La connaissance plus approfondie du phénomène devait montrer que c'est essentiellement la perte de l'eau (eau libre et eau liée) provoquée par la congélation qui entraîne la dégradation des structures cellulaires. Aussi certains chercheurs pensèrent que des corps provoquant une déshydratation ménagée atténueraient les lésions : des solutions sucrées, divers composés organiques furent essayés avec plus ou moins de succès.

Une nouvelle orientation fut imprimée par l'introduction de substances protégeant des méfaits de la congélation. En 1946, Jean Rostand signala qu'il avait conservé pendant une vingtaine de jours du sperme de grenouille congelé à -6°C avec adjonction de 5 à 10 p. 100 de glycérine.

Cette communication resta inconnue des chercheurs britanniques dirigés par Parkes, qui dès 1945 avait constaté qu'une quantité importante de spermatozoïdes humains survivaient à la congélation à -195°C ou -79°C , suivie d'une décongélation rapide à 37°C , alors que la température de -20°C était néfaste. En 1949, cette équipe montra que la glycérine protégeait des spermatozoïdes d'oiseau, congelés à -79°C dans la neige carbonique. Les modalités d'utilisation de la glycérine devaient ensuite être précisées notamment par Polge et Rowson (1951 et 1952).

L'action protectrice de la glycérine lors de la congélation fut étudiée et largement exploitée en biologie. Lovelock en 1953 protégea des globules rouges avec ce produit ; Fulton et Smith en 1953 l'appliquèrent sur *Entamoeba histolytica*, et signalèrent la toxicité du glycérol pour une concentration supérieure à 10 p. 100, ce dernier point devait être confirmé en 1954 par Marquardt pour *Trichomonas foetus*, dont la technique de congélation était décrite par Lévine et Marquardt (1954) ; Polge et Soltys en 1957 étudièrent l'action de la glycérine sur divers Trypanosomes.

D'autres auteurs complétèrent nos connaissances en ce domaine. Par exemple Mazur (1960-1962) étudia la congélation de divers micro-organismes et protozoaires, et conclut que la meilleure survie était obtenue après refroidissement lent, mais estima que seules importaient la congélation et la décongélation alors que la durée de conservation n'intervenait pas. La possibilité de résultats plus favorables grâce à une congélation lente, contrairement à l'opinion répandue, avait déjà été signalée par Weinmann et Mc Allister qui avaient étudié en 1947 la congélation de divers protozoaires pathogènes, helminthes et leptospores en présence de sérum dilué, et qui citaient à l'appui de leurs travaux ceux de Rahm et de Breedis.

Après les succès de conservation dus au glycérol, cependant limités par la toxicité de ce produit, sa lenteur à traverser les membranes cellulaires et même son impossibilité à les franchir comme pour certaines hématies, on rechercha d'autres agents pro-

tecteurs. Lovelock et Bishop (1959) écrivaient que les agents protecteurs devaient être non toxiques, de poids moléculaires bas, solubles dans l'eau et diffusibles dans les cellules. Etudiant un nouveau produit, le diméthyl-sulfoxyde (DMSO), ils remarquèrent sa pénétration rapide dans les cellules (pour les hématies 30 secondes de contact avant la congélation à -79°C suffisent avec le DMSO, alors qu'il faut deux heures avec le glycérol), mais ils constatèrent néanmoins que le sperme de taureau était mieux protégé par le glycérol. En 1961 Walker et Ashwood-Smith écrivaient que le DMSO tendait à supplanter le glycérol pour les trypanosomes.

C'est alors qu'Andjus et ses coll. (1961-1962) qui avaient antérieurement fait de très intéressantes expériences de résistance au froid d'organes ou d'animaux entiers comme le rat, essayèrent le diméthyl-sulfoxyde, qui leur parut donner de meilleurs résultats à -190°C que le glycérol et surtout être moins toxique.

M. le Professeur J. A. Thomas, connaissant les difficultés rencontrées jusqu'ici dans la conservation des Toxoplasmes nous proposa d'essayer le diméthyl-sulfoxyde dont les qualités avaient permis des améliorations dans la conservation de matériels fragiles. Sur ses conseils nous avons cherché à apprécier le pouvoir protecteur du DMSO pour la congélation et la conservation des toxoplasmes à basses températures, à préciser son action, à déterminer son efficacité comparée à celle de la glycérine.

Avant-propos

Nicolle et Manceaux (1908) virent les premiers, et d'une façon fortuite, des toxoplasmes chez un gondi (*Ctenodactylus gondi*). Un seul des rongeurs capturés dans le canon de Toujane en Tunisie, par Charles Nicolle à son retour de l'île de Djerba où il avait subi « le plus bel échec du monde », montra les premiers toxoplasmes connus : « de quelques heures passées à Toujane, je revenais les mains pleines ». « Ainsi va la fortune ; elle vient quand elle veut si on ne sait pas l'attirer » dira-t-il. Ce nouveau parasite fut baptisé : *Toxoplasma gondii*.

En fait si le gondi semble assez rarement infecté par le Toxoplasme et que l'explication de cette première infection observée vienne d'être donnée par Ben Rachid (1970), ce parasite fut retrouvé sur presque tous les animaux, mais ce n'est qu'en 1939 que Wolf, Cowen et Paige montrèrent sa présence d'une façon certaine chez l'homme. Depuis la deuxième guerre mondiale, les cas humains rapportés se sont multipliés et la toxoplasmose compte aujourd'hui parmi les maladies en augmentation.

Position systématique.

Toxoplasma gondii, classé dans le sous-embranchement des Sporozoaires, fut longtemps considéré comme ayant des affinités incertaines ; en effet, son parasitisme strict ne permit tout d'abord d'observer qu'une division par scissiparité multiple au sein du cytoplasme de la cellule-hôte, cette division aurait pu indiquer une ascendance flagellée

(Chatton et Blanc, 1917-1951). Van Thiel (1956) mit en évidence au microscope électronique une sorte de cône invaginé (le conoïde de *Gustafson* confirmé depuis par d'autres auteurs) qui rapprochait aussi *Toxoplasma gondii* des grégaires. Lorsque la division est intense, on assiste parfois à des formations simulant de véritables schizontes : les pseudo-kystes ; les kystes observés dans les coupes de cerveaux provenant de cas de toxoplasmoses congénitales sont-ils, eux, de véritables schizontes ? Chatton et Blanc (1917-1951) après Laveran et Mesnil (1899) croyant que ces kystes ne présentaient pas d'enveloppes propres, pensaient être en présence d'une schizogonie de type coccidien. Mais Vander Waaij (1960) étudiant la paroi des kystes d'une souche avirulente conclut à la production de la paroi par le parasite et non par l'hôte.

Ces dernières années plusieurs auteurs ont photographié au microscope électronique des figures de division par endogénèse typique dont Senaud en 1967 à qui cette observation, jointe aux caractères structuraux fait rapprocher *Toxoplasma* de *Sarcosystis* et inclure ces deux parasites dans la classe des *Toxoplasmea*, dans le sous-embanchement des *Sporozoa* avec les *Eimeria*, *Plasmodium* et *Lankesterella*.

D'autres hypothèses, nombreuses, ont été émises. De toute façon, le problème de la classification exacte de *Toxoplasma gondii* restait irrésolu puisqu'on ignorait tout de la gamétogénèse des toxoplasmes et s'il y en avait une. Des observations récentes semblent devoir éclairer la question d'un jour nouveau.

En 1965, Hutchison rapportait que l'infection à *Toxoplasma gondii* avait été transmise par le chat domestique, expérimentalement infecté et en 1967 il émettait l'hypothèse d'une transmission possible des toxoplasmes par un nématode parasitant fréquemment l'intestin du chat : *Toxocara cati*. Dubey et Jacobs confirmaient tous deux ces observations, mais Jacobs obtenait aussi la transmission de *Toxoplasma* chez des chats exempts de nématodes et concluait : « Nous pouvons en déduire l'hypothèse d'une forme de multiplication de *Toxoplasma gondii* produite par l'intestin du chat nourri de protozoaires enkystés » ce qu'Hutchison et coll. confirmaient dès 1968.

Il restait à trouver cette « forme de multiplication de *Toxoplasma gondii* », dès 1969 Work et Hutchison publiaient successivement qu'ils avaient isolé dans les fécès de chat des organismes kystiques capables de reproduire la toxoplasmose chez la souris, ces kystes, évoluant en deux semaines en deux masses distinctes se rapprochaient des oocystes d'*Isospora*. En 1970 Hutchison, Dunachie, Siim et Work trouvaient sur des coupes d'intestin grêle de tels chats et à l'intérieur de cellules épithéliales, un chizonte mature contenant six cellules nettement distinctes et un *macrogamétocyte*. Puis Sheffield et Melton ; Frenkel, Dubey et Miller confirmèrent et complétèrent ces observations. Expérimentalement dans les cellules épithéliales de l'intestin du chat, on a pu retrouver des macrogamétocytes, des microgamétocytes, des schizontes ; les oocystes libérés dans les fécès semblent très résistants, ils évoluent en deux sporokystes à l'intérieur de chacun desquels se différencient quatre sporozoïtes. Les sporozoïtes des oocystes ingérés par un animal évoluent en trophozoïtes, forme végétative de multiplication active. Eventuellement les trophozoïtes produisent des kystes. Oocystes, trophozoïtes, kystes ingérés par le chat, produisent à nouveau macrogamétocytes et microgamétocytes dans l'intestin du chat, fermant ainsi le cycle (fig. 1).

Dans la nature, l'extrême diffusion du toxoplasme, décelée indirectement par les différentes réactions sérologiques serait due au réservoir tellurique infecté par le chat, mais aussi à la contamination des carnivores par les kystes d'homéothermes (fig. 2).

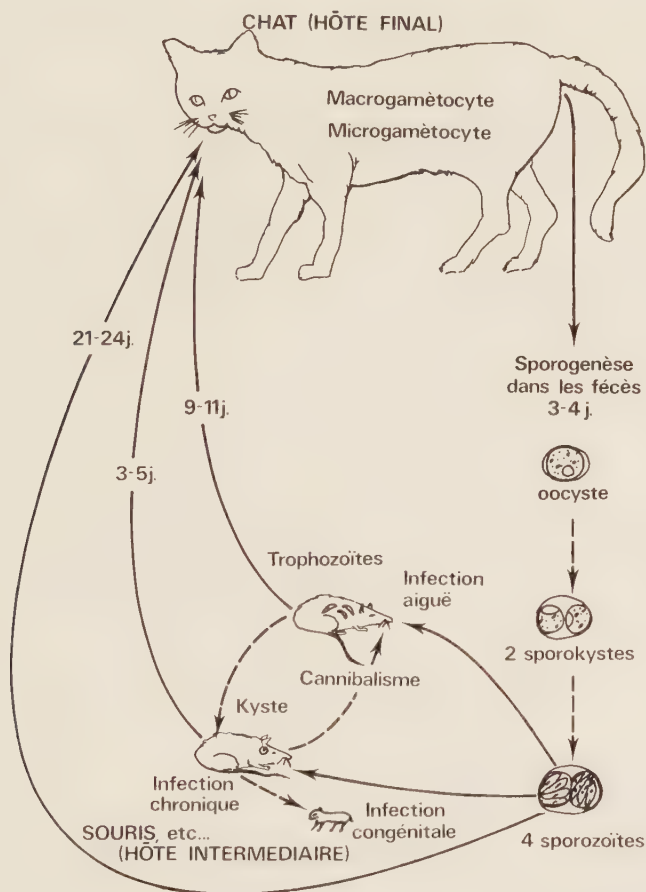


FIG. 1. — Cycle de *Toxoplasma gondii* (d'après J.K. Frenkel, J.-P. Dubey et N.L. Miller, 1970)

A la lumière de ces constatations, il semble bien qu'un des derniers Protozoaires parasites de l'homme à être mal connu ait livré les secrets de ses affinités et qu'on doive, bien sûr, laisser *Toxoplasma gondii* dans le sous-embranchement des *Sporozoa*, classe des *Coccidiomorphea*, ordre des *Eimeriida*, sous-ordre des *Holoeimeriina*, famille des *Diplosporidae*, mais qu'il soit rattaché au genre : ***Isospora***.

Dès lors, abandonnera-t-on le terme historique de *Toxoplasma* pour celui d'*Isospora* et confondra-t-on *Toxoplasma gondii* et *Isospora bigemina*? Avant de conclure, il sera nécessaire de vérifier les hypothèses qui vont à l'encontre de ces constatations, en particulier celle qui rappelle la présence d'autres espèces d'*Isospora* dans l'intestin du chat.

Une autre question avait été débattue, et beaucoup plus aisément résolue que celle des affinités de *Toxoplasma* : celle de la pluralité des espèces de toxoplasmes. L'examen

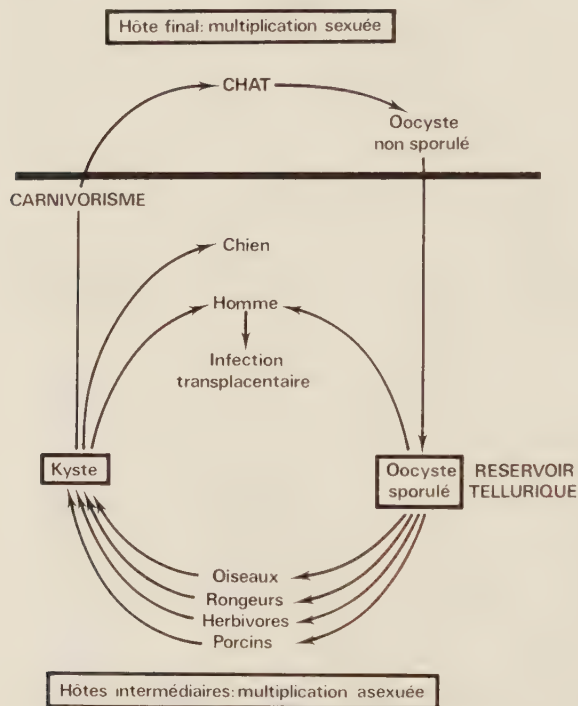


FIG. 2. — Cycle de *Toxoplasma gondii* dans la nature (d'après Desmonts, 1971)

approfondi des nombreuses espèces de toxoplasmes, correspondant chacun à l'espèce animale sur laquelle la souche avait été isolé, conclut à leur identité. Il semble qu'on soit en présence d'un genre *Toxoplasma* ne comportant qu'une espèce : *Toxoplasma gondii* (Weiman, 1944 - Manwell et coll., 1945). Certains auteurs maintenaient pour les toxoplasmes des oiseaux qui paraissaient assez difficilement transmissibles aux mammifères, le genre *Atoxoplasma*. A ce sujet Jadin J. (comm. pers.) a isolé sur souris des souches typiques de *Toxoplasmes* à partir de canaris et de pigeons : par contre des oiseaux sont porteurs de *Lankesterelle*, morphologiquement semblables aux *Toxoplasmes*,

or les *Lankesterella* ne se multiplient pas sur souris, le genre *Atoxoplasma* n'aurait été qu'une confusion avec le genre *Lankesterella*.

Morphologie. (fig. 3).

Toxoplasma gondii se présente dans sa forme extracellulaire comme un élément allongé, ovoïde ou en croissant dont une extrémité est renflée, arrondie et l'autre plus pointue ; il mesure 4 à 6 μ de long sur 2 à 3 μ de large. Si on l'observe au microscope ordinaire, en immersion, coloré par la coloration de May-Grünwald-Giemsa, on voit un volumineux noyau, avec un ou deux nucléoles, situé vers l'extrémité arrondie ; vers l'extrémité effilée se trouve un espace plus clair, rond que Nicolle et Manceaux appelaient « corps paranucléaire » ; c'est une sorte de corps homogène ou une vacuole renfermant des granules dont l'aspect varie suivant les modes de fixation de la préparation. On n'a jamais pu mettre en évidence de flagelles (Manwell et Drobeck, 1953) ; une membrane légère pouvant servir d'organe de locomotion (Meyer et coll., 1935) n'a pas été confirmée, et *Toxoplasma gondii* est généralement considéré comme immobile, cependant l'examen à l'état frais au contraste de phase permet d'observer des sortes de pirouettes et de détentes qui concourent à donner une certaine impression de mouvement. D'après Senaud (1967) les fibres sous-pelliculaires, sorte de tubules, au nombre de 22, situés sous le complexe membranaire, contribueraient aux mouvements de torsion et de flexion du toxoplasme.

C'est le microscope électronique qui nous a fait connaître la structure fine de *Toxoplasma gondii*. Les premiers, Gustafson et coll., en 1954 (confirmés en 1956 par Van Thielt et depuis par de nombreuses études) décrivent le conoïde à l'extrémité effilée du parasite ; rôle de fixation, de sécrétion, de nutrition ? Aucune hypothèse n'a encore pu s'imposer. Gustafson confirmé par Ludvik (1958), dont les clichés furent publiés, virent des formations allongées en massue partant du conoïde : les toxonèmes. Enfin Olisa (1963) décrit une nouvelle structure la « lamella spiralis » en relation avec le noyau et le reticulum endoplasmique.

Des études récentes ont confirmé ces observations : nous retiendrons le travail de Surjus, Lavillaureix et Gruner (1963), que nous compléterons par celui, plus récent de Senaud (1967) dont l'iconographie est particulièrement remarquable. Ces auteurs décrivent le noyau, contenant un volumineux nucléole, séparé du cytoplasme par une double membrane à pores qui se prolonge dans le cytoplasme par le réticulum endoplasmique disposé en longues lames juxtaposées ; le cytoplasme riche en ribosomes et en cavités membranaires, parfois tubulaires, souvent volumineuses, étendues d'un pôle à l'autre du parasite ; l'appareil de Golgi, juxtanucléaire à structure typique ; les mitochondries tubulaires ; diverses inclusions osmiophiles, granuleuses, éparses dans le cytoplasme. Au pôle antérieur effilé se trouve le conoïde, curieux organe troncoïde de structure hélicoïdale dont les bords forment une saillie plus ou moins marquée et limitent un court canal communiquant avec le cytoplasme ce qui confirmerait l'opinion de Gustafson tendant à faire du conoïde un oropharynx résiduel ; d'après Garnham (1966), le toxoplasme utilise le conoïde pour pénétrer dans la cellule, Norby et Lycke (1967) y ont d'ailleurs détecté des enzymes comme la phosphatase acide qui faciliteraient la

pénétration du parasite dans la cellule : une très belle photographie de ce phénomène a été publiée par Jadin et Creemers en 1968. Un ou deux anneaux surmontent le conoïde, et une structure annulaire est disposée concentriquement et extérieurement à

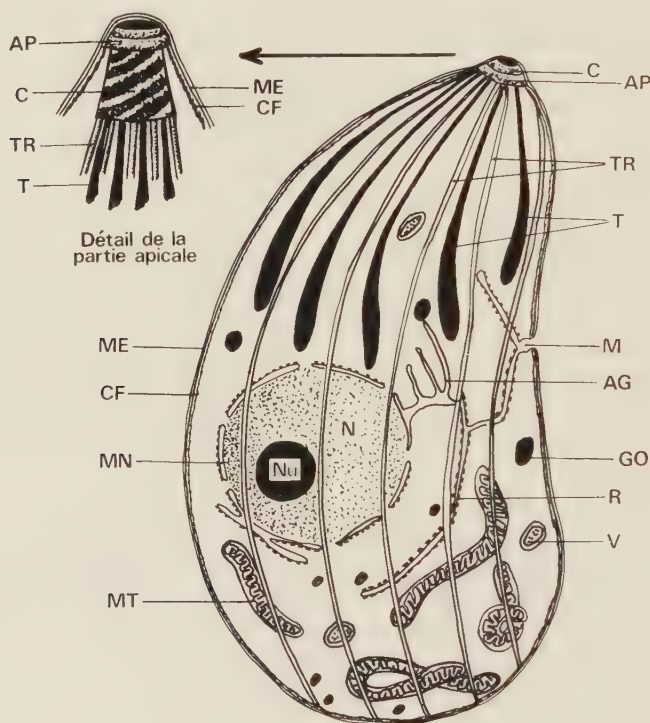


FIG. 3. — Schéma de *Toxoplasma gondii*; AG : appareil de Golgi; AP : anneau polaire; C : Conoïde; CF : couche sous-fibrillaire; GO : granulation osmiophile; M : microphyle; ME : membrane unitaire à double feuillet; MN : membrane nucléaire; MT : mitochondrie; N : noyau; Nu : nucléole; R : réticulum endoplasmique; T : toxonème; TR : tubule radiale ou sous pelliculaire; V : vacuole

cet organe. En arrière le conoïde se continue par des masses osmiophiles appelées toxonèmes ou rhoptries allongées en masses, à extrémité postérieure renflée d'un diamètre de 10 à 20 μ , allant d'un bout à l'autre du parasite; les auteurs leur attribuent un rôle possible dans la nutrition du parasite, d'autres un rôle sécrétoire. Ces toxonèmes étudiés par Vermeil et coll. (1965) semblent de longs tubes creux à structure cloisonnée rappelant celle des mitochondries, ce qui confirmerait plutôt l'hypothèse d'un rôle sécrétoire. Dans le quart antérieur de la cellule, on a signalé, en petit nombre, des

sarconèmes, dont le rôle est mal défini et qui ont souvent été confondus avec les toxonèmes. Le complexe membranaire limitant le parasite est généralement considéré comme formé de deux membranes trilaminées ; en 1969, Vivier et Petitprez tendaient à montrer que la membrane interne serait en fait formée de deux membranes trilaminées très rapprochées. La paroi cellulaire s'invagine dans le cytoplasme en formant le micropyle signalé par Garnham en 1962, le micropyle ne s'observant pas souvent, certains auteurs ont douté de son existence, mais Senaud en 1967 en a publié des clichés ultra-microscopiques nets montrant qu'il se prolonge par des canalicules dans le cytoplasme et posant la question des relations de ces canaux avec le reticulum endoplasmique. La « lamella spiralis » décrite par Olisa en 1953 comme une structure ayant des relations avec le noyau et le reticulum endoplasmique est peut être à rapprocher des canalicules du micropyle. Sous le complexe membranaire se trouvent 22 tubules longitudinales (nervures radiales ou fibres sous-pelliculaires) insérées sur un anneau proche du conoïde parcourant la cellule en spirales longitudinales intervenant dans les mouvements du parasite.

Nous sommes donc devant une cellule dont la structure est très complexe et qui dans sa forme végétative isolée, n'a cependant aucune protection contre les agressions extérieures. On ne connaissait, jusqu'aux observations d'Hutchison et coll. aucune forme de résistance, exceptées ces formations multinucléées que sont les kystes.

Parasitisme et pouvoir pathogène.

Sabin et Olitsky étudièrent en 1937 la culture d'une souche de toxoplasme isolée en 1935 et rapportèrent les grands traits de ce parasitisme :

- multiplication possible seulement à l'intérieur des cellules vivantes, jamais de culture en dehors d'un organisme vivant ;
- division par fission longitudinale ;
- formation de kystes ou de pseudokystes.

La multiplication du parasite semble essentiellement demander une cellule vivante, mais être peu exigeante quant à la nature de ces cellules : cellules du tissu réticulo-endothélial, mais aussi parenchymateuses. En cultures cellulaires, *Toxoplasma gondii* se développe sur des cellules de toutes origines, marquant peut-être une légère préférence pour les cellules de première explantation par rapport aux cellules de souches. Le parasite ayant pénétré dans le cytoplasme d'une cellule, grossit à l'intérieur d'une vacuole, puis se divise longitudinalement en deux ; les divisions binaires de chaque nouveau parasite se poursuivant ensuite. Cette multiplication est particulièrement aisée à observer en culture cellulaire où l'on peut voir successivement dans la vacuole 2, 4, 8, 16 toxoplasmes disposées en rosettes et, enfin une sorte de pseudokyste contenant probablement 32 parasites ; à ce stade, la cellule éclate libérant les toxoplasmes qui vont parasiter d'autres cellules.

Un autre mode de multiplication a été mis en évidence par Senaud (1967), retrouvé par Jadin et Creemers (1968) et depuis vu assez couramment, c'est l'endogénie : à l'intérieur d'un toxoplasme naissent deux cellules filles qui se libèrent ensuite de la

cellule-mère, la formation des membranes de ces cellules-filles lors de leur sortie de la cellule-mère a été bien étudiée par Vivier et Petiprez (1969).

Dans l'organisme, un processus de division intense a lieu pour les souches virulentes provoquant une infection aiguë sur les animaux sensibles. Lorsque l'organisme résiste et qu'on est en présence d'une toxoplasmose latente, on observe des formations particulières : les kystes à l'intérieur desquels on voit un grand nombre de noyaux, sans que les parasites semblent individualisés, et qui sont limités par une membrane sécrétée par les toxoplasmes ou plus exactement par action et réaction de l'hôte et du parasite. Ces kystes se retrouvent particulièrement dans le cerveau et dans les muscles.

Ce sont ces kystes qui expliquaient la conservation et la dissémination des toxoplasmes dans la nature ; la membrane qui les entoure est, en effet, beaucoup plus résistante aux agressions extérieures ou physiologiques (en particulier au suc gastrique). Ce problème sera sûrement à considérer sous un jour différent, après les constatations récentes de Work, Hutchison et coll., (1969-1970), les kystes semblant être des impasses parasitaires.

On peut se demander pourquoi on ne s'est pas adressé aux kystes, formes de résistance, plutôt qu'aux formes végétatives, pour la conservation des souches ? En fait, les souches virulentes tuent l'animal avant la formation des kystes, en outre lors d'une maladie latente, les kystes sont assez peu nombreux et le contrôle pour s'assurer de la pérennité de la souche serait difficile et hasardeux ; c'est pourquoi on s'adresse la plupart du temps aux formes végétatives facilement contrôlables.

Le pouvoir pathogène des toxoplasmes est assez variable : généralement très virulents pour les petits animaux, ils ont néanmoins été retrouvés chez presque toutes les espèces animales : Mammifères, Oiseaux, Reptiles.

Il y a beaucoup de cas inapparents révélés quelquefois par de jeunes individus plus sensibles et primo-infectés en contact avec des adultes porteurs du parasite (veau, porcelet, chiots, etc.).

Chez l'homme cette affection, bien que reconnue plus tardivement, semble assez répandue, le plus souvent aussi sous forme inapparente. Elle est particulièrement grave pour le fœtus dont la mère est infectée et pour le nouveau-né ; chez l'adulte elle semble provoquer surtout des formes ganglionnaires et oculaires.

Résistance et conservation.

Nous avons déjà parlé de la plus grande résistance des kystes, mais en fait la résistance des formes végétatives *in vitro* est beaucoup plus connue et d'ailleurs plus aisée à étudier.

Les facteurs naturels pouvant avoir une influence sur la dissémination de *Toxoplasma gondii* ont été examinés.

Kobayashi et Jacobs (1963) ont trouvé les formes végétatives beaucoup plus sensibles à diverses radiations que les kystes libres, eux-mêmes l'étant plus que ceux encore inclus dans des cerveaux. A ces mêmes radiations, une de leur souche très virulente fut plus résistante qu'une souche avirulente.

En 1961, Lund et coll., avait constaté que les rayons X étaient sans action sur les parasites, que des taux élevés de rayons gamma détruisaient leur activité mitotique, mais pas leur antigénicité et qu'ils étaient tout à fait insensibles à une pré-irradiation des cellules dans lesquelles ils allaient se multiplier.

Stone et Manwell (1963) éliminaient la possibilité de dissémination des formes végétatives par les eaux (distillées, physiologiques, saponifiées) étant donné leur faible résistance dans ces milieux.

C'est probablement la température qui a la plus grande influence sur la conservation des toxoplasme dans la nature.

Kass en 1955 constata que des cerveaux de souris dont les carcasses avaient été laissées à $+ 4^{\circ}\text{C}$ pendant 6 à 8 jours étaient encore infectantes, de même si elles étaient laissées 2, 3 jours à température de la pièce ou un jour à 37°C . Si les souris étaient placées à $- 20^{\circ}\text{C}$, aucun passage n'était obtenu, alors que la congélation, 12 à 16 heures à $- 10^{\circ}\text{C}$, permettait encore un isolement. Mais ici c'est la résistance à la fois des formes végétatives et surtout des formes kystiques qui est étudiée : en outre, à l'action de la température, il faut ajouter l'action destructive des produits de l'autolyse des rongeurs.

Wildfuhr (1956) s'adressant à un liquide péritonéal de souris étudiait la viabilité des formes végétatives de *Toxoplasma gondii* après un séjour plus ou moins long à différentes températures. Dans le liquide desséché à $+ 4^{\circ}\text{C}$, les parasites résistaient complètement 8 heures, partiellement 12 heures et étaient tués en 24 heures ; à $18-20^{\circ}\text{C}$ pendant 1 heure, ils étaient viables et presque tous tués en 8 heures ; à 37°C après 30 minutes, ils commençaient à perdre leur virulence et à mourir.

En milieu humide, la conservation est meilleure puisqu'à $+ 4^{\circ}\text{C}$, la virulence est complètement conservée pendant 20 jours, partiellement pendant 25 jours et plus du tout après 30 jours. A $18-20^{\circ}\text{C}$, la conservation est complète après 5 jours, partielle après 10 jours et nulle après 15 jours ; par contre à 37°C , elle est nulle après 6 jours, partielle après 5 jours et complète pendant 2 jours seulement. La conservation est donc nettement meilleure en milieu humide quelle que soit la température.

Par contre, rares sont les études portant sur des températures plus basses, ne cherchant plus à établir la résistance naturelle de *Toxoplasma gondii* aux conditions extérieures à sa vie parasitaire, mais à conserver expérimentalement le parasite en dehors de son hôte vivant (animal ou cultures cellulaires).

En 1938, Sabin essayant de séparer un agent transmissible de tissus infectés par des toxoplasmes, constate qu'en congelant ces tissus à $- 80^{\circ}\text{C}$, le protozoaire est toujours tué.

Dans un article général sur les toxoplasmes écrit en 1945 par Manwell et ses collaborateurs, un paragraphe traitait de la conservation aux basses températures de ces parasites. Utilisant la technique préconisée par Manwell et Jeffery en 1942, puis Manwell et Edgett en 1943, ils congelaient les parasites dans un mélange alcool-neige carbonique, les y conservaient quelques minutes, et trouvaient aux parasites après ce traitement un aspect normal, mais constataient cependant qu'ils étaient incapables de produire une infection. Weinmann et Mac Allister (1947) constataient

que sans substance protectrice *Toxoplasma gondii* résistait au phénomène de congélation et décongélation à -79°C ; seulement en l'absence de toute conservation à cette température.

Aussi devant ces quelques essais infructueux, Mac Farlane en 1948 conseilla de conserver des membranes d'œufs infectés de toxoplasmes en évitant la congélation, et en les plaçant à $+4^{\circ}\text{C}$, ainsi la conservation était possible 1 mois.

En 1952, Manwell poursuivant ses essais avec Drobeck arrive à conserver ce protozoaire 18 jours au réfrigérateur (sans préciser la température) en suspendant les tissus en lait écrémé, et Jacobs, Hones et Fulton rapportant qu'ils n'ont jamais pu conserver de toxoplasmes congelés et desséchés, mais qu'ils ont pu les conserver simplement en les mettant au réfrigérateur ; cependant devant les résultats incertains de leur conservation, ils concluent à l'importance de la teneur en protéines de l'exsudat péritonéal contenant les parasites.

C'est en 1956 qu'est publié le beau travail d'Eyles, Coleman et Cavanaugh qui avaient étudié la conservation des toxoplasmes congelés. Ils condamnaient la congélation rapide qui ne leur avait apporté que des échecs et préconisaient la congélation lente jusqu'à -79°C en présence de glycérol à 5 ou 10 p. 100, une conservation à -79°C suivie d'une décongélation rapide, ce qui leur avait permis de conserver des toxoplasmes 209 jours.

Après les premiers échecs de conservation à basse température, l'adjonction de la glycérine apportait donc des réussites, tempérées cependant par une baisse de virulence, lente il est vrai, mais certaine puisque Steward et Feldmann en 1965, congelant des toxoplasmes se multipliant sur cellules en culture devaient faire après leur conservation de 360 jours, à -79°C avec 10 p. 100 de glycérine, un passage aveugle avant de récupérer la souche.

La seule application du diméthyl-sulfoxyde comme agent protecteur dans la congélation de *T. gondii*, que nous connaissons a été faite par Ressler, Leroy et Goedvriend (1965) à partir de sang de souris hépariné et conservé à -196°C dans l'azote liquide.

En 1968, Jadin et Creemers écrivaient encore « la meilleure méthode pour conserver une souche de toxoplasme est de l'inoculer à la souris par voie péritonéale » ; ce qui représente un travail astreignant à raison de deux passages par semaine et en 1969 l'O.M.S., dans un de ses rapports techniques « La toxoplasmose » publiait : « La conservation des parasites par congélation est un sujet important qui mérite d'être étudié plus avant, en particulier du point de vue des conditions à remplir pour obtenir de meilleurs résultats ».

Aussi nous avons pensé que les nombreux laboratoires qui entretiennent des souches de toxoplasmes (en particulier pour les diagnostics sérologiques) n'ont généralement pas à leur disposition la température de l'azote liquide, ce qui est d'ailleurs notre cas, et nous avons fait nos essais dans l'optique suivante : *trouver la conservation la plus simple et la plus sûre de Toxoplasma gondii à la température la moins basse possible*. Nous avons en cela voulu répondre aux chercheurs de l'O.M.S. qui recommandaient « ... d'améliorer les méthodes d'entretien et de conservation des

souches sur tissus animaux et en cultures tissulaires afin de prolonger la durée de conservation du parasite, notamment à l'état congelé, tout en modifiant le moins possible ses caractères biologiques ».

Matériels et techniques

Le parasite

Multiplication sur la Souris

SOUCHES ETUDIEES

Presque tout ce travail a été fait avec la souche B_{12} que nous connaissons bien, les autres souches nous ont été données par divers laboratoires et ont servi à comparer et généralement confirmer les résultats obtenus avec la nôtre.

- *Souche B_{12}* (Giroud P., Le Gac P., Roger F. et Gaillard J. A., 1953).

Elle a été isolée en Oubangui-Chari chez un sujet présentant une fièvre exanthématique. Elle est entretenue depuis par passages continus de péritoine de souris à péritoine de souris.

- *Souche Belge D_{36}* (Wiktor I. J., 1950).

Elle fut isolée aux environs de Stanleyville en 1949 à partir du lapin. Elle avait provoqué une épidémie chez des lapins et des pigeons dans une ferme d'élevage, on y avait compté jusqu'à 80 p. 100 de mortalité. Elle nous a été envoyée par le Prof. Jadin d'Anvers.

- *Souche $Z_{3/4}$* (Romaña-1964).

Elle nous a été transmise par le Prof. Romaña en juin 1964 qui l'avait isolée à Toulouse de l'humeur aqueuse d'un œil de bovidé. Nous n'avons pas eu connaissance d'une publication faite sur ce travail.

- *Souche $R.H.-C_{36}$* (Sabin-1941).

Elle fut isolée en 1941 aux Etats-Unis par Sabin, en inoculant à des souris du tissu nerveux d'un enfant de 6 ans qui avait succombé à une encéphalite après avoir présenté des signes neurologiques graves et une lymphadénite généralisée. En 1948, cette souche avait déjà fait l'objet de plus de 400 passages sur souris. Elle est actuellement la plus répandue dans les laboratoires du monde s'intéressant aux toxoplasmes. C'est le Prof. Jadin d'Anvers qui nous l'a donnée.

ENTRETIEN DES SOUCHES

Les souches sont généralement entretenues par passages péritonéaux directs d'exsudat toxoplasmique de souris à souris, 4 à 5 jours après l'inoculation. On peut espacer légèrement les passages en diluant notablement l'inoculum injecté afin que les souris meurent plus tardivement, mais l'irrégularité des délais d'infection rend cette pratique aléatoire.

Le passage de cerveau de souris parasitées devrait permettre l'entretien de la souche d'une façon moins astreignante que par la voie péritonéale. Mais, deux défauts sont à imputer à cette méthode : on ne peut contrôler d'une façon simple et directe la présence de toxoplasmes dans le cerveau qu'on inocule, ensuite par cette voie les délais de mortalité sont beaucoup moins stables et souvent beaucoup plus rapides que prévu : deux raisons qui entraînent bien souvent la perte de la souche.

Au laboratoire des Rickettsioses de l'Institut Pasteur-Paris, la souche B₁₂ est entretenue depuis 17 ans par passages péritoine-péritoine sur souris, ces passages en certaines circonstances étant doublés par des passages cerveau-péritoine. Il en fut de même pour la souche Z₃₄, pendant plusieurs mois. Actuellement toutes les souches sont conservées à — 79 °C, et seule la souche B₁₂ pour les besoins divers continue à être entretenue sur souris d'une façon ininterrompue.

Multiplication sur cellules en culture

Aux cellules de souches qui nous auraient obligé à un entretien régulier et sur lesquels les toxoplasmes semblent moins bien proliférer, nous avons préféré des cellules de première explantation. Pour cela, nous avons choisi les cultures de fibroblastes d'embryon de poulet, dont la croissance est rapide et facile.

Le froid

TEMPÉRATURES

Nous avons choisi les températures dont nous disposions et qui sont en général obtenues facilement en laboratoire. Une de nos armoires frigorifiques donnait une température de + 5 °C à ± 1 °C.

Les températures de — 28 ° C et — 40 °C étaient celles de deux de nos congélateurs.

La température de — 79 °C fut maintenue d'une façon continue dans des vases Dewar contenant de la neige carbonique, ces vases étant placés dans un congélateur à — 40° C. La neige carbonique était ajoutée dans les vases Dewar, deux fois par semaine. Lorsque le matériel à conserver à — 79 °C fut trop important pour être contenu dans des vases Dewar, un meuble en bois à double parois contenant de la laine de verre fut rempli de pains de neige carbonique au sein desquels le matériel fut placé. Des contrôles de températures faits lors de l'ouverture du couvercle, ne montrèrent que de faibles variations de température (de l'ordre de 10 °C au maximum).

Enfin, un essai fut fait à — 195 °C dans une bouteille à azote liquide (2).

(2) Nous remercions M^{me} Lwoff d'avoir eu la gentillesse d'héberger nos tubes pendant quelque temps dans son appareil à azote liquide.

TECHNIQUES DE CONGÉLATION

Deux techniques sont utilisées : *l'une rapide* fut proposée par Luyet, découlant de son hypothèse de seuil de cristallisation qu'il fallait franchir rapidement afin d'éviter la formation de cristaux déchirant les structures, *l'autre lente*, liée à l'adjonction de substances protectrices et au remplacement de l'eau par ces dernières.

Pour atteindre relativement vite — 28 °C ou — 40 °C, les tubes scellés ou bouchés hermétiquement au caoutchouc contenant le produit à congeler étaient mis directement dans les congélateurs ; pour atteindre lentement ces températures, les tubes étaient entourés de coton cardé avant d'être placés dans les congélateurs.

Pour descendre rapidement à — 79 °C, le matériel à congeler était introduit dans des ampoules rondes scellées qui étaient plongées dans un mélange réfrigérant, alcool absolu-neige carbonique, en leur imprimant un mouvement de rotation rapide : ainsi le matériel était congelé en une pellicule fine, répartie sur les parois de l'ampoule.

Pour atteindre lentement — 79 °C, les ampoules étaient placées 30 minutes à + 4 °C, puis 1 heure à — 28 °C, 1 heure à — 40 °C et enfin à — 79 °C, sans isolants spéciaux.

Lors de l'essai à — 195 °C, le même processus a été suivi pour descendre à — 79 °C, température où les ampoules ont été laissées deux heures avant d'être portées à — 195 °C.

CONSERVATION

Il est essentiel que la conservation aux différentes températures ne subissent aucune variation de température, en raison du phénomène de recristallisation migratrice qui se produit lors du réchauffement. Ceci est particulièrement important avec une installation « artisanale » à — 79 °C comme la nôtre : il faut veiller à ce que les vases Dewar soient toujours suffisamment remplis de neige carbonique et que, lorsqu'on recharge en neige carbonique, on rajoute simplement la neige nouvelle au-dessus de l'ancienne et non que l'on enlève l'ancienne pour la remplacer par de la nouvelle, cette dernière pratique nous ayant causé quelques déboires. Il est préférable d'avoir un congélateur à — 80 °C qui permet une conservation simple et un rangement rationnel ; à défaut nous avons eu à notre disposition un meuble isolant de grandes dimensions contenant de la neige carbonique, où les ampoules sont placées dans des boîtes métalliques.

DÉCONGÉLATION

Lors d'essais préliminaires, la décongélation lente fut pratiquée en entourant les tubes de coton cardé et en les laissant à température de la pièce, cette méthode, comme nous l'attendions, n'a donné que des déboires et par la suite la décongélation rapide a toujours été pratiquée en plongeant immédiatement au sortir du conservateur à basse température, les ampoules dans un bain-marie à 37 °C.

Les substances protectrices

Notre but a été principalement d'étudier le pouvoir cryoprotecteur du diméthylsulfoxyde (3) sur les toxoplasmes, ce corps sera généralement désigné dans la suite du texte par DMSO.

Le DMSO fut préparé pour la première fois en 1866 par Alexandre Sayizeff, c'est un sous-produit de l'industrie du bois et de la pâte à papier.

Le diméthyl-sulfoxyde $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix} > \text{S} = \text{O}$ (PM = 78)

est, d'après Mac Gregor (1967), une molécule de structure pyramidale dont la liaison soufre-oxygène est fortement polaire, l'atome de soufre étant l'atome positif du dipôle ; cette polarité ainsi que sa géométrie oriente l'organisation des molécules de DMSO qui sont associées en chaîne par attraction dipolaire.

Le DMSO se mélange en toutes proportions à l'eau comme les alcools. Lindberg (cité par Mac Gregor, 1967) considère que la liaison hydrogène entre DMSO et eau est 1 fois 1/3 plus forte qu'entre deux molécules d'eau, ce que confirment Rammler et Zaffaroni (1967), ces auteurs pensant que le pouvoir pénétrant du DMSO à travers les barrières de protéines dépend de cette forte liaison avec l'eau.

A partir du fait que le DMSO se substitue à la liaison eau de la protéine, Rammler (1967) rechercha son action sur des systèmes enzymatiques : il ne trouva pas de perte significative et irréversible d'activité enzymatique ; Mc Cord et coll., (1969), Farkas et coll., (1969) trouvent que le DMSO stimule certaines réactions enzymatiques et n'a pas d'effet sur d'autres.

Outre cette importante affinité pour l'eau, le DMSO augmenterait d'une façon générale et réversible toutes les perméabilités cellulaires. Franzt J. et coll., (1967) constataient lorsqu'on ajoute du DMSO dans une solution baignant le côté épidermique de la peau d'une grenouille, une diminution du potentiel électrique et parallèlement une modification des perméabilités des ions Cl^- et Na^+ ; Leiris et coll., en 1969 rapportaient les mêmes faits et Lee en 1970 décelait la présence de groupes de charge influençant la perméabilité cellulaire.

Les propriétés de solvant du DMSO le firent utiliser tout d'abord dans l'industrie, puis en thérapeutique, particulièrement pour les médicaments insolubles dans l'eau, dont il facilite la pénétration en traversant les barrières biologiques des cellules servant ainsi de transporteurs à de nombreux produits. Il facilite la pénétration des antibiotiques et des fongicides dans les racines et écorces de végétaux, il est susceptible de servir de transport d'éléments nutritifs chez les plantes. En médecine, il est ajouté à des agents antimycosiques (Hiemisch, 1970). Il peut être l'adjuvant des thérapeutiques classiques en rhumatologie, mais paraît renforcer leur action ; dans les affections articulaires et les traumatismes musculaires, son effet serait spectaculaire (Rosenbaum

(3) Diméthyl-sulfoxyde : Prolabo-Rhône Poulenc.

et coll., 1965) ; il paraît avoir des propriétés anti-inflammatoires, vasodilatatrices et une certaine action bactériostatique. Une propriété intéressante est qu'il solubilise le collagène, particulièrement le collagène brûlé ou partiellement dénaturé, ce qui a permis de l'employer dans le traitement des brûlures (Middleton et coll., 1970). Dans le traitement des gelures, il évite les nécroses et par application prophylactique, il peut même éviter les lésions (Wood et coll., 1970).

Ces nombreuses applications en biologie auxquelles il faut ajouter celle qui nous intéresse le plus : l'action cryoprotectrice, ont été rapportées entre autres par Thibault, (1965) et Leake et coll., (1967), qui mettaient en garde contre un enthousiasme peut-être un peu hâtif.

A doses élevées et répétées, le DMSO a une action tératogène chez l'embryon de poulet et le fœtus de mammifère (Caujolle et coll., 1967) ; Cros et coll., (1970) étudiant l'effet inhibiteur du DMSO sur la croissance des membres de l'embryon de poulet, le rapporte aux troubles vasculaires provoqués par ce corps.

Ce produit est peu toxique chez les animaux supérieurs par voie orale, péritonéale et veineuse. Par voie orale, à doses élevées et répétées. Vogin et coll., 1970 a provoqué la mort de singes en 15 à 53 semaines. La voie veineuse ne provoquent chez le chat qu'une apnée et une hypotension transitoire (Distefano, 1965), ou une inflammation périvasculaire avec thrombose locale et anémie hémolytique réversible (Wilson et coll., 1965), cependant une action hémolytique n'est pas douteuse surtout en présence de concentrations élevées de DMSO (Ansel et coll., 1966), (Norred et coll., 1970), (Vaille et coll., 1970).

La voie dermique peut provoquer des dermatites localisées lors d'administration répétée, ce qui en a fait interdire l'usage en cosmétologie. Il n'est pas cancérigène, et s'est même révélé plus toxique pour les lymphocytes leucémiques que pour les lymphocytes normaux et ne serait pas sans effet sur des carcinogénèses expérimentales de la peau (Stenback, 1970) ; en permettant à certains médicaments de traverser la barrière cytoplasmique, il en exalte les effets cytostatiques (Stjernvall, 1969 ; Lalonde, 1969).

Le DMSO est plus toxique pour les cellules en culture et cette toxicité est d'autant plus prononcée que la température est plus élevée (Malinin et coll., 1967 ; Bouroncle et coll., 1970 ; Greene et coll., 1970). Cette toxicité pouvait être retrouvée avec les toxoplasmes, mais la rapidité de pénétration du DMSO dans les cellules limitant le contact aux températures défavorables (20 °-37 °C), laissait espérer une toxicité faible lors de la congélation, car le DMSO avec son poids moléculaire bas, sa grande solubilité dans l'eau, sa facilité à passer à travers les membranes cellulaires réunit les qualités demandées à un corps cryoprotecteur. Le mécanisme de protection du DMSO lors de la congélation a d'ailleurs été étudié : s'il prévient la formation de cristaux de glace, il semble maintenir la concentration des électrolytes grâce aux modifications de perméabilité membranaire qu'il favorise ; en raison de sa petite taille, il est capable de pénétrer au contact des molécules de protéines et de s'y substituer à certaines molécules d'eau (Farrant, 1965 ; Pribord et coll., 1969 ; Van den Berg et coll., 1969).

Dans notre travail, le DMSO fut introduit à divers pourcentages dans l'exsudat péritonéal pur ou dilué. Etant donné sa rapidité de pénétration, il fut inutile de prendre des précautions particulières en ce qui concerne les délais avant la congélation, celle-ci intervenant aussitôt la distribution en ampoules et leur scellement terminé.

Comme substance cryoprotectrice de référence, nous avons fait appel à la glycérine (4) : $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ (PM 92), dont l'emploi s'est largement répandu pour la conservation à basses températures de divers matériels biologiques.

Ce trialcool ne semble pas présenter une liaison aussi forte avec l'eau que le DMSO, son poids moléculaire est plus élevé et sa vitesse de pénétration dans les cellules est beaucoup plus lente : de l'ordre de quelques secondes pour le DMSO, pour le glycérol, elle est d'une à deux heures avec la plupart des cellules, mais certaines, comme les hématies de bovidés, ne laissent pas pénétrer ce corps (Lovelock et Bishop, 1959). A cause de ce dernier facteur, la glycérine fut introduite de la même façon que le DMSO, mais le mélange fut laissé 1 heure à la température de la pièce avant de procéder aux diverses étapes de la congélation. Bien entendu lors d'expériences comparatives, la solution avec DMSO était aussi laissée 1 heure à température de la pièce, à cette température, la toxicité du DMSO (et peut-être du glycérol) sur les cellules est plus élevée qu'à $+ 4^\circ\text{C}$ (Bouroncle et coll., 1970 ; Greene et coll., 1970), mais nous avons constaté lors d'observations antérieures que les toxoplasmes souffrent plus d'un séjour à $+ 4^\circ\text{C}$ qu'à $20-22^\circ\text{C}$.

Résultats

La plupart des essais ont été faits avec la souche B_{12} que nous connaissons mieux et qui présentait l'avantage de n'avoir jamais été congelée, mais les résultats ont été comparés à ceux fournis par les autres souches.

Pour toutes ces souches, l'exsudat péritonéal a été prélevé sur des souris infectées, cet exsudat ne contenant que des formes végétatives. Après congélation le produit virulent était réinoculé par voie péritonéale à des souris neuves. Afin que ces épreuves ne soient pas faussées par une éventuelle sensibilité de nos souris aux substances protectrices introduites dans les exsudats congelés, nous avons éprouvé la résistance de ces animaux vis-à-vis de ces produits.

Des souris ont été inoculées par voie péritonéale avec 1 ml ou 2 ml de DMSO ou de glycérine : aucune souris n'a succombé ou montré des signes de maladie. D'autres souris inoculées par la même voie avec des doses identiques à celles contenues dans nos produits congelés (DMSO ou glycérine à 5, 10 ou 20 p. 100) ont de même résisté.

On peut conclure donc à la parfaite tolérance de nos animaux à ces deux produits.

(4) Glycérine pure $d = 1,26$ — Prolabo-Rhône Poulenc.

Détermination de la méthode de congélation

Nous avons cherché à savoir si la méthode de congélation rapide préconisée par Luyet, et abandonnée dans la plupart des cas était applicable aux toxoplasmes et à la comparer à la méthode de congélation lente.

De l'exsudat péritonéal de souris non dilué, avec ou sans diméthylsulfoxyde, a été congelé et stocké à — 79 °C pendant 4 jours. Ces suspensions de parasites furent inoculées à des souris par voie péritonéale.

— 79 °C 4 jours	Congélation lente	Congélation rapide	Témoin sans congélation
Liquide péritonéal seul	0* 11°-15° j. Toxo +	0 12° j.-VB Toxo 0	0 5°-6° j. Toxo +
+ DMSO 10 p. 100	0 5°-8° j. Toxo +	0 15°-16° j. Toxo 0	0 6°-7° j. Toxo +
+ DMSO 20 p. 100	0 9°-11° j. Toxo +	0 7°-15° j. Toxo 0	0 6°-7° j. Toxo +

(*) 0 : mort de la souris. Nous avons fait suivre ce signe de deux nombres, le premier représentant le jour où la première souris du lot inoculé est morte, le second représentant le jour où la dernière souris est morte ou éventuellement a survécu (VB).

Nous avons ponctionné les souris à partir du 5° jour afin de contrôler la présence de toxoplasmes. Nous arrêtons les ponctions dès que nous avons trouvé des parasites dans une série. De ce fait les délais de mortalité des souris appartenant à des séries ayant des toxoplasmes sont plus justes que ceux des souris appartenant à des séries exemptes de toxoplasmes, ces dernières succombant à une infection bactérienne due à des ponctions répétées.

On peut noter sur cet essai que la congélation rapide est tout-à-fait néfaste aussi bien sans DMSO, qu'avec (celui-ci n'ayant probablement pas le temps d'agir) et qu'au contraire la congélation lente est plus favorable même sans substance protectrice : ici intervient probablement la composition de l'exsudat qui doit agir dans une certaine mesure, comme substance protectrice.

Lors d'une seconde expérience pour confirmer les premières constatations aucune ponction ne fut faite et seuls des contrôles relatifs à la présence éventuelle des parasites furent tentés sur les cadavres.

Les résultats de la congélation rapide avec DMSO sont défavorables ; il faut une dose de 20 p. 100 de DMSO pour retrouver des toxoplasmes, mais avec un allongement de la survie de la souris (9 jours au lieu de 7 avec la congélation lente).

Ces deux séries d'expériences ne faisaient pratiquement pas intervenir la conservation à — 79 °C (3 jours) qui risque d'accuser les méfaits d'une mauvaise congélation.

— 79 °C 3 jours	Congélation lente	Congélation rapide	Témoin sans congélation
Liquide péritonéal seul	VB Toxo 0	0 14° j.-VB Toxo ?	0 5° j. Toxo +
+ DMSO 10 p. 100	0 7°-8° j. Toxo +	VB Toxo 0	0 5°-7° j. Toxo +
+ DMSO 20 p. 100	0 7° j. Toxo +	0 9° j. Toxo +	0 5° j. Toxo +

Nous avons comparé un même stock d'exsudats péritonéaux congelés lentement ou rapidement, sans être conservé et conservé 1 mois à — 79 °C. Nous avons aussi comparé les résultats obtenus avec de l'exsudat pur ou dilué au 1/10 en eau physiologique sans adjonction de DMSO et avec adjonction de 10 ou 20 p. 100 de DMSO. Pour rendre les résultats plus sensibles, des lots de souris ont été inoculés pour chaque série avec des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} d'exsudat.

D'après le tableau p. 23 :

— Il est nécessaire d'ajouter une substance protectrice aux suspensions de toxoplasmes, ces parasites fragiles, ne supportant pas la congélation. L'éventuelle protection, souvent invoquée, due à la composition de l'exsudat péritonéal donne des résultats trop incertains pour permettre la conservation de souches, et ne semble pas se perpétuer dans le temps.

— Avec la méthode de congélation rapide, si quelques résultats favorables sont obtenus avec 10 p. 100 de DMSO sans séjour à — 79 °C, aucune conservation n'est obtenue après 1 mois à — 79 °C.

Ces résultats venant corroborer ceux généralement admis par les chercheurs ayant expérimenté sur d'autres cellules, nous adopterons la méthode de congélation lente.

Ayant constaté que la méthode de congélation rapide était à écarter, la conservation à la température de — 25 °C couramment utilisée au laboratoire pour conserver des souches de toutes natures étaient-elle valable pour les toxoplasmes ? La conservation à — 25 °C pendant 4 jours fut comparée à celle à — 79 °C (cf. p. 24).

Dans un autre essai, nous avons comparé la congélation lente d'un exsudat dilué au 1/10 en présence de 10 p. 100 de DMSO aux températures de — 25 °C, — 40 °C et — 79 °C ainsi que la conservation des toxoplasmes 50 jours à ces températures.

Témoin :

sans congélation : 0 7 j. Toxo +

— 25 °C : 30 min. 0 7 j. Toxo + ; 50 jours VB

— 40 °C : 1 h 0 8 j. Toxo + ; 50 jours VB

— 79 °C : 1 h 0 9 j. Toxo + ; 50 jours 0 11 j. Toxo +

	Congélation lente Conservation 4 jours	
	— 25 °C	— 79 °C
Liquide péritonéal seul	VB Toxo 0	0 11-15° jours Toxo +
+ DMSO 10 p. 100	VB Toxo 0	0 5-8° jours Toxo +
+ DMSO 20 p. 100	0 8° jour * Toxo 0	0 9-11° jours Toxo +

* après deux ponctions

Les températures intermédiaires de — 25 °C et — 40 °C, ne peuvent être que des étapes de la congélation lente jusqu'à — 79 °C et aucune conservation valable n'existe à ces températures. Ce sont d'ailleurs les conclusions auxquelles ont abouti de nombreux auteurs pour divers protozoaires.

D'après ces expériences préliminaires, nous adopterons *la congélation lente à — 79 °C, en présence de DMSO* et nous chercherons à en déterminer les facteurs les plus favorables. (Dans la suite et lorsque nous ne préciserons pas la méthode de congélation, il s'agira de congélation lente).

Influence de la dilution de l'exsudat lors de la congélation et de la conservation.

Certains auteurs pensent que l'exsudat exerce une action protectrice sur les toxoplasmes soumis à la congélation. En comparant la congélation d'un exsudat pur et d'un exsudat dilué au 1/10 avec conservation brève à — 79 °C, il est vrai que les résultats sont meilleurs avec l'exsudat non dilué.

Est-il préférable d'ajouter le DMSO à un exsudat pur, conjugant ainsi les deux phénomènes protecteurs ou vaut-il mieux introduire la substance protectrice dans un exsudat dilué ?

L'exsudat péritonéal d'une souris toxoplasmique est prélevé sans anticoagulant. Aussi les exsudats riches étant souvent épais coagulent-ils généralement très vite. Lors d'expériences préliminaires, l'exsudat fut employé pur et il était souvent difficile d'incorporer le DMSO, ce qui expliquerait peut-être partiellement les résultats irréguliers constatés.

Pour déterminer l'influence de la dilution de l'exsudat lors de la congélation, un même exsudat a été congelé à — 79 °C pur ou dilué au 1/10 avec 5 ou 10 p. 100 de DMSO pendant 24 heures, puis réinoculé à des souris.

Dilution des inoculums		10-1	10-2	10-3	10-4	10-5
Exsudat pur	DMSO 5 p. 100	0 13 j.-VB Toxo ±	0 10 j.-VB Toxo ?	VB Toxo 0	VB Toxo 0	0 18 j.-VB Toxo ?
	DMSO 10 p. 100	0 22 j.-VB Toxo 0	0 10-18 j. Toxo +	0 9-24 j. Toxo ?	0 11-24 j. Toxo +	0 20-21 j. Toxo ?
Exsudat dilué au 1/10	DMSO 5 p. 100	0 8 j. Toxo +	0 9-11 j. Toxo +	0 11 j.-VB Toxo +	0 20-21 j. Toxo ?	0 18 j.-VB Toxo ?
	DMSO 10 p. 100	0 9-10 j. Toxo +	0 10 j. Toxo +	0 10 j.-VB Toxo +	VB Toxo 0	VB Toxo 0

Ces mêmes ampoules furent conservées à — 79 °C, 10 jours et 60 jours :

Conservation 10 jours :

Dilutions des inoculums		10-1	10-2	10-3	10-4	10-5
Exsudat pur	DMSO 5 p. 100	0 12 j. Toxo +	0 11 j.-VB Toxo +	VB Toxo 0	0 12 j.-VB Toxo ?	VB Toxo ?
	DMSO 10 p. 100	0 9 j. Toxo +	0 10-11 j. Toxo +	VB Toxo 0	VB Toxo 0	VB Toxo 0
Exsudat au 1/10	DMSO 5 p. 100	0 11 j. Toxo +	0 9-10 j. Toxo +	0 14 j. Toxo +	0 22 j.-VB Toxo ?	VB Toxo 0
	DMSO 10 p. 100	0 8-10 j. Toxo +	0 9-10 j. Toxo +	0 10-13 j. Toxo +	0 22-38 j. Toxo ?	VB Toxo 0

Conservation 60 jours :

Dilutions des inoculums		10-1	10-2	10-3	10-4	10-5
Exsudat pur	DMSO 5 p. 100	0 10-11 j. Toxo +	0 11 j. VB Toxo +	VB Toxo 0	VB Toxo 0	VB Toxo 0
	DMSO 10 p. 100	0 10 j. Toxo +	0 10 j. Toxo +	0 11 j. VB Toxo +	VB Toxo 0	VB Toxo 0
Exsudat au 1/10	DMSO 5 p. 100	0 8 j. Toxo +	0 10 j. Toxo +	0 10 j. Toxo +	VB Toxo 0	VB Toxo 0
	DMSO 10 p. 100	0 8 j. Toxo +	0 9-10 j. Toxo +	0 10 j. VB Toxo +	0 10 j. VB Toxo +	VB Toxo 0

C'est particulièrement après 10 et 60 jours de conservation que se dessine la meilleure protection du DMSO avec l'exsudat dilué au 1/10, cette dilution favorise la diffusion du produit et par conséquent une meilleure action de son pouvoir protecteur.

Lors de la conservation de la souche Z₃₄ avec 10 p. 100 de DMSO pendant 4 ans à — 79 °C, les résultats furent les suivants :

Dilutions des inoculums	10-1	10-2	10-3
Exsudat congelé dilué au 1/10	0 9 j. Toxo +	0 11 j.-VB Toxo +	VB
Exsudat congelé pur .	0 10 j.-VB Toxo +	VB	VB

Pour une conservation prolongée c'est aussi la congélation de l'exsudat dilué au 1/10 qui donna les meilleurs résultats.

Détermination de la dose protectrice de DMSO

Dès nos premiers essais nous avons constaté une moins bonne conservation à — 79 °C en présence de 20 p. 100 de DMSO. Ce produit parfaitement bien supporté par les souris a-t-il une action sur les protozoaires ?

Un exsudat péritonéal de souris riche en toxoplasmes fut réparti en trois ampoules : à l'une rien ne fut ajouté à l'exsudat, à la seconde 10 p. 100 de DMSO et à la troisième 20 p. 100. Ces ampoules furent laissées 30 mn à la température du laboratoire et leur contenu réinoculé à des souris.

	Inoculation souris
Exsudat seul	0 5-6 j. Toxo +
Exsudat + DMSO 10 p. 100	0 6-7 j. Toxo +
Exsudat + DMSO 20 p. 100	0 6-7 j. Toxo +

Dès l'adjonction de DMSO, on constate un allongement de la survie des souris. Pour préciser ce résultat, cette expérience fut répétée en allongeant le temps de contact à 1 h 30 mn et en cherchant pour chaque solution la dose limite infectante.

Exsudat seul			+ DMSO 10 p. 100		+ DMSO 20 p. 100	
10 ⁻¹	0 5-6 j.	Toxo +	0 5-6 j.	Toxo +	0 5-8 j.	Toxo +
10 ⁻²	0 6-10 j.	Toxo +	0 7-8 j.	Toxo +	0 5-7 j.	Toxo +
10 ⁻³	0 8 j.	Toxo +	0 5-9 j.	Toxo +	0 7-9 j.	Toxo +
10 ⁻⁴	0 8 j. VB	Toxo +	0 8-12 j.	Toxo +	0 9-12 j.	Toxo +
10 ⁻⁵	0 7-9 j.	Toxo +	0 11 j. VB	Toxo +	0 9 j. VB	Toxo +
10 ⁻⁶	0 8-9 j.	Toxo +	0 11-25 j.	Toxo +	0 11 j. VB	Toxo +
10 ⁻⁷	0 9-11 j.	Toxo +	0 11 j. VB	Toxo +	0 11 j. VB	Toxo +
10 ⁻⁸	0 9-11 j.	Toxo +	0 12 j. VB	Toxo +	VB	Toxo 0

Mise à part l'unique souris vivante à la dilution de 10⁻⁴ de l'exsudat seul, on peut dire que cet exsudat était encore infectant à la dilution de 10⁻⁸, dès l'adjonction de DMSO, nous observons un allongement de la survie des souris et même avec 20 p. 100 de DMSO la dilution 10⁻⁸ n'est plus infectante. Cet effet toxique du DMSO sur les toxoplasmes paraît devenir notablement néfaste à la dose de 20 p. 100. Cette toxicité est-elle renforcée par la conservation à — 79 °C ?

	Témoins sans congélation	Conservation — 79° C	
		1 h.	50 j.
Exsudat dilué au 1/10	0 7° j. Toxo +		
Exsudat dilué au 1/10 + DMSO 10 p. 100	0 7° j. Toxo +	0 9° j. Toxo +	0 11 j. Toxo +
Exsudat dilué au 1/10 + DMSO 20 p. 100	0 7° j. Toxo +	0 11° j. Toxo +	VB Toxo 0

Ici, aucune ponction n'a été pratiquée sur les souris : la mort a donc été causée par les toxoplasmes dont la présence a été recherchée sur les cadavres. Dans cette expérience, on voit nettement l'action défavorable du DMSO à 20 p. 100 au cours de la conservation à — 79 °C.

Nous nous sommes alors demandé si l'adjonction de DMSO à 5 p. 100 ne serait pas encore plus favorable lors de la conservation, que la dose de DMSO à 10 p. 100 et à plus forte raison 20 p. 100. A un mélange d'exsudats péritonéaux de souris dilués au 1/10, nous avons ajouté 5-10 au 20 p. 100 de DMSO.

Ces trois solutions ainsi que leurs dilutions de raison 10, ont été inoculées à des souris avant congélation, puis après congélation à — 79 °C, et conservation 21 jours et 34 jours à cette température.

Congé- lation et Conser- vation à — 79° C	DMSO								
		10—1	10—2	10—3	10—4	10—5	10—6	10—7	10—8
Pas de congé- lation	5 p. 100	0 4-7 j. Toxo +	0 7-8 j. Toxo +	0 7-8 j. Toxo +	0 8 j. Toxo +	0 8 j. Toxo +	0 10 j. Toxo +	0 5-12 j. Toxo +	0 10 j. Toxo +
	10 p. 100	0 6-7 j. Toxo +	0 7-8 j. Toxo +	0 7 j. Toxo +	0 8-9 j. Toxo +	0 8-9 j. Toxo +	0 9 j. Toxo +	0 10-11 j. Toxo +	0 9 j. VB Toxo +
	20 p. 100	0 8-9 j. Toxo +	0 8-9 j. Toxo +	0 8-10 j. Toxo +	0 11-19 j. Toxo +	0 11-22 j. Toxo +	0 14-24 j. Toxo +	0 VB Toxo ?	0 12 j. VB Toxo +
Conser- vation 21 jours à — 79° C	5 p. 100	0 7-8 j. Toxo +	0 8-11 j. Toxo +	0 11-12 j. Toxo ?	0 23 j. VB Toxo 0	0 VB Toxo 0	0 VB Toxo 0	0 9 j. VB Toxo +	0 14-15 j. Toxo ?
	10 p. 100	0 7-8 j. Toxo +	0 9-10 j. Toxo +	0 11-23 j. Toxo +	0 4-9 j. Toxo +	0 15 j. VB Toxo ?	0 10-14 j. Toxo 0	0 12-21 j. Toxo ?	0 9 j. VB Toxo ?
	20 p. 100	0 10-11 j. Toxo +	0 14-28 j. Toxo ?	0 7 j. VB Toxo ?	0 15 j. VB Toxo ?	0 14 j. Toxo 0	0 17 j. VB Toxo ?	0 11-15 j. Toxo ?	0 10-14 j. Toxo ?
Conser- vation 34 jours à — 79° C	5 p. 100	0 8-9 j. Toxo +	0 9-10 j. Toxo +	0 10-12 j. Toxo +	0 22 j. VB Toxo ?	0 10-19 j. Toxo +	0 VB Toxo 0	0 VB Toxo 0	0 VB Toxo 0
	10 p. 100	0 8 j. Toxo +	0 9 j. Toxo +	0 9-10 j. Toxo +	0 VB Toxo 0	0 VB Toxo 0	0 VB Toxo 0	0 VB Toxo 0	0 VB Toxo 0
	20 p. 100	0 10 j. VB Toxo +	0 VB Toxo 0	0 VB Toxo 0	0 VB Toxo 0	0 VB Toxo 0	0 VB Toxo 0	0 VB Toxo 0	0 VB Toxo 0

Sans congélation on constate une légère toxicité du DMSO, proportionnelle à la dose de produit, ce phénomène s'accroît avec le séjour à — 79 °C, au point que la conservation de toxoplasmes est mauvaise avec 20 p. 100 de DMSO après 34 jours à — 79 °C.

La dose de 5 p. 100 de DMSO suffit-elle à conférer une protection aux toxoplasmes en évitant le phénomène toxique ? Les résultats ci-dessus tendent à le faire penser, et le tableau ci-après confirme aussi le léger avantage de la dose 5 p. 100 de DMSO.

En inoculant des dilutions d'exsudat (méthode plus sensible pour juger de l'infectivité de l'inoculum), nous trouvons généralement des résultats un peu plus favorables à l'adjonction de 5 p. 100 de DMSO. Cependant dans des conservations de

Dilutions des inoculums		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
24 h à — 79 °C	+ DMSO 5 p. 100	0 8 j. Toxo +	0 9-11 j. Toxo +	0 11 j. VB Toxo +	0 20-21 j. Toxo ?	0 18 j. VB Toxo ?
	+ DMSO 10 p. 100	0 9-10 j. Toxo +	0 10 j. Toxo +	0 10 j. VB Toxo +	VB Toxo 0	VB Toxo 0
10 j. à — 79 °C	+ DMSO 5 p. 100	0 11 j. Toxo +	0 9-10 j. Toxo +	0 14 j. Toxo +	0 22 j. VB Toxo ?	VB Toxo 0
	+ DMSO 10 p. 100	0 8-10 j. Toxo +	0 9-10 j. Toxo +	0 10-13 j. Toxo +	0 22-38 j. Toxo ?	VB Toxo 0
60 j. à — 79 °C	+ DMSO 5 p. 100	0 8 j. Toxo +	0 10 j. Toxo +	0 10 j. Toxo +	VB Toxo 0	VB Toxo 0
	+ DMSO 10 p. 100	0 8 j. Toxo +	0 9-10 j. Toxo +	0 10 j. VB Toxo +	0 10 j. VB Toxo +	VB Toxo 0
100 j. à — 79 °C	+ DMSO 5 p. 100	0 8 j. Toxo +	0 9-10. j Toxo +	0 10-11 j. Toxo +	VB	VB
	+ DMSO 10 p. 100	0 9-10 j. Toxo +	0 10 j. Toxo +	0 10 j. VB Toxo +	VB	VB

routine de nos différentes souches de toxoplasmes, il nous est arrivé d'enregistrer quelques échecs avec la dose de 5 p. 100 de DMSO et non avec la dose de 10 p. 100. Lors d'une conservation très longue comme celle de la souche *Z*₃₄ pendant 5 ans et demi à — 79 °C, l'avantage pour la dose de 10 p. 100 de DMSO n'était que très léger.

DMSO 5 p. 100	1 souris 0 9° j.	2 souris 0 10° j.	1 souris VB
	Toxo +	Toxo +	
DMSO 10 p. 100	2 souris 0 9° j.	2 souris 0 10° j.	
	Toxo +	Toxo +	

On peut donc conclure que le pouvoir toxique du DMSO fait écarter les doses élevées (20 p. 100 et au-dessus), mais que pouvoir toxique et pouvoir protecteur interfèrent pour que les doses de 5 et 10 p. 100 soient utilisables lors de la conservation à — 79 °C des toxoplasmes, en donnant une légère préférence au pouvoir protecteur supérieur de la dose 10 p. 100 de DMSO.

Durée de conservation à — 79 °C et pouvoir infectant

Nous avons distingué deux phénomènes souvent confondus : la virulence d'une souche et ce que nous appellerons son pouvoir infectant. La virulence d'une souche est un caractère propre à cette souche, un caractère héréditaire contenu dans l'unité

infectante (ici le toxoplasme) ; ce caractère peut apparemment être modifié par les conditions de milieu, mais réapparaît lorsque des conditions déterminées se retrouvent. Pour les toxoplasmes on connaît par exemple des souches hautement virulentes pour la souris, mais aussi des souches avirulentes pour ce rongeur. Or, il est courant de dire pour divers agents infectieux que la congélation abaisse la virulence des souches : cette opinion nous paraît erronée, la congélation aussi bien conduite soit-elle, détruit toujours quelques individus, et l'inoculation qui suit la décongélation, est en réalité faite avec un matériel dilué, quelquefois dans de larges proportions. D'ailleurs, ne dit-on pas qu'après une congélation, « il faut faire des passages en série pour relever la virulence de la souche » alors qu'on ne constate que l'enrichissement de la culture par la multiplication de l'agent virulent.

D'autre part lorsqu'on inocule des dilutions d'un exsudat péritonéal de souris toxoplasmiques on observe des délais de survie de plus en plus long allant de 5 jours pour la dilution 10^{-1} à 11 jours pour la dilution 10^{-7} . Dans ce cas on ne parle pas de perte de virulence.

Il semble que la congélation entraîne une sorte de dilution des toxoplasmes vivants capables de se multiplier chez la souris.

Ainsi les toxoplasmes congelés observés en contraste de phase (l'étude microscopique est exposée dans la 2^e partie) montrent pour certains un aspect de lyse. Lorsque la totalité de la population congelée présente cet aspect lysé (congélation sans substance protectrice de l'exsudat dans de mauvaises conditions par exemple), la souche n'est pas récupérée par inoculation sur souris. La conservation est d'autant meilleure que le pourcentage de toxoplasmes à aspect normal ou presque normal est important : mais la congélation ne permet jamais d'obtenir 100 p. 100 de toxoplasmes d'aspects normaux, donc c'est un pourcentage plus ou moins grand de « cadavres » qui est réinoculé aux souris, ce qui explique l'allongement plus ou moins important de la survie de ces animaux.

L'adjonction de DMSO sans congélation provoque déjà un léger allongement de la survie de la souris, cela seulement après un contact bref, *in vitro*, des parasites et du produit (30 mn). Le temps de survie des souris inoculées avec l'exsudat congelé et conservé à -79°C , dilué au 1/10, passe à 7 et 11 jours suivant la durée de la conservation, alors que le temps normal de survie est de 5 jours.

Les souches de toxoplasmes conservées à -79°C sont périodiquement décongelées, réinoculées à la souris, et recongelées à -79°C ; en général dès le second passage l'exsudat prélevé était normalement infectant.

Ainsi la souche Z_{34} congelée 39 jours à -79°C avec 10 p. 100 de DMSO tuait la souris en 9 jours, l'exsudat d'une de ces souris, passé sur d'autres souris, les tuait en 4 jours. Cette même souche conservée 83 jours à -79°C avec du DMSO tuait la souris en 8 à 9 jours, l'exsudat d'une souris morte au 9^e jour tuait les souris en 4 jours, et son cerveau passé à d'autres souris les tuait normalement en 8 jours. La souche C_{36} congelée 83 jours à -79°C avec DMSO tuait la souris en 11 jours, l'exsudat passé à des souris les tuait en 5 jours.

Pour l'étude sérologique des toxoplasmes après congélation (3^e partie), au premier passage nous devons attendre le 6^e jour pour pouvoir obtenir un exsudat suffisamment abondant pour être prélevé, mais dès le second passage l'exsudat pouvait être prélevé 48 heures après l'inoculation.

L'examen en contraste de phase des exsudats décongelés concorde en partie avec les résultats trouvés sur souris et permet d'évaluer la valeur d'une congélation et de la conservation à — 79 °C. Tout d'abord après une congélation à — 79 °C d'un exsudat péritonéal seul et sa conservation 4 jours à cette température, en contraste de phase les toxoplasmes étaient à peine reconnaissables, et une coloration au May-Grünwald-Giemsa montra des toxoplasmes très abîmés ; l'inoculation de ce produit à des souris ne permit pas de retrouver la souche.

Une même suspension à laquelle on avait ajouté 5 ou 10 p. 100 de DMSO congelée et conservée 10 jours à — 79 °C donnait les résultats suivants :

10 j. à — 79 °C	Inoculations aux souris	Examens en contraste de phase
+ DMSO 5 p. 100	0 11 j. Toxo +	29 p. 100 Normaux
		46 p. 100 Abîmés
		25 p. 100 Lysés
+ DMSO 10 p. 100	0 8-10 j. Toxo +	40 p. 100 Normaux
		40 p. 100 Abîmés
		20 p. 100 Lysés

De même avec une autre suspension à laquelle on avait ajouté 5 ou 10 p. 100 de DMSO et 10 p. 100 de glycérine conservée 3 ans et demi à — 79 °C.

	Inoculations aux souris	Examens en contraste de phase
+ DMSO 5 p. 100	0 10-11 j. Toxo +	50 p. 100 Normaux
		25 p. 100 Abîmés
		25 p. 100 Lysés
+ DMSO 10 p. 100	0 10-15 j. Toxo +	50 p. 100 Normaux
		50 p. 100 Lysés
+ Glycérine 10 p. 100 . . .	VB	Moins de 5 p. 100 Normaux, le reste difficilement reconnaissable.

On voit donc que les chances de récupérer une souche de toxoplasmes après congélation sont directement en relation avec la quantité de toxoplasmes d'aspect normal.

D'après nos observations, une partie des parasites d'une suspension de toxoplasmes ne résiste pas à la congélation, aussi satisfaisante que soit celle-ci en ce qui concerne la récupération de la souche. Ce déchet, au moins égal à 50 p. 100, pour de bonnes conservations, explique l'allongement du temps de survie : par la dilution de l'exsudat d'une part, et par la réaction de l'hôte suscitée par l'inoculation des parasites tués d'autre part.

Conservation à — 79 °C et virulence de la souche

Cet aspect de la question est étroitement lié au pouvoir infectant, cependant il nous a semblé que si après congélation, un exsudat inoculé à des souris les tuait avec allongement du temps de survie, l'exsudat prélevé sur une de ces souris ayant eu le pouvoir de tuer la souris, transmis à d'autres souris devrait tuer la souris en 4 à 6 jours, ainsi qu'il est classique pour les souches virulentes.

Lorsqu'on prélève l'exsudat d'une souris inoculée avec la dilution 10^{-7} d'un exsudat de la souche B_{12} jamais congelée, morte au 11^e jour et, qu'on inocule à des souris, celles-ci meurent normalement en 4 à 6 jours. C'est un résultat identique que l'on retrouve avec une souris inoculée avec un exsudat B_{12} congelé en présence de 10 p. 100 de DMSO 1.267 jours à — 79 °C elle meurt en 10 jours, et son exsudat tue normalement la souris en 5-6 jours.

Pour étudier ce phénomène de façon plus sensible, nous avons comparé des passages de dilutions de la souche B_{12} jamais congelée et de cette souche après congélation.

	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Sans congélation	0 4-6 j. Toxo +	0 4-6 j. Toxo +	0 8 j. Toxo +	0 9-10 j. Toxo +	0 9 j. Toxo +	0 10-12 j. Toxo +
100 j. à — 79 °C DMSO 5 p. 100	0 9-10 j. Toxo +	0 10-12 j. Toxo +	0 11 j. VB Toxo +	VB	VB	VB
↓						
1 ^{er} passage	0 6-8 j. Toxo +	0 8 j. Toxo +	0 8 j. Toxo +	0 8-10 j. Toxo +	0 11 j. VB Toxo +	0 11 j. Toxo +
↓						
2 ^e passage	0 6 j. Toxo +	0 6-7 j. Toxo +	0 7-8 j. Toxo +	0 8 j. Toxo +	0 9 j. Toxo +	0 9-10 j. Toxo +

Si au premier passage, aux dilutions 10^{-1} et 10^{-2} , on pourrait parler de « baisse de virulence », de 10^{-3} à 10^{-6} les résultats sont comparables, ainsi qu'au deuxième passage.

La souche Z_{34} conservée 83 jours à -79°C avec 10 p. 100 de DMSO, tua les souris en 9 jours, avec présence de toxoplasmes ; le cerveau d'une de ces souris passé par voie péritonéale à des souris les tua normalement en 8 jours, avec présence de toxoplasmes, et l'exsudat péritonéal tua d'autres souris en 4 jours, l'exsudat de ces dernières souris ayant servi à une conservation à -79°C . Des résultats identiques furent obtenus avec la souche C_{36} conservée 92 jours à -79°C .

Avec les souches B_{12} - C_{36} - D_{36} conservées, congelées et repassées sur souris pour des études sérologiques, nous n'avons pas constaté de baisse de virulence qui aurait probablement entraîné des difficultés dans la récolte des quantités importantes d'exsudat nécessaires à ces études.

Conservations obtenues

Nos souches de toxoplasmes sont conservées maintenant d'une façon routinière à -79°C selon les modalités suivantes :

- Exsudat dilué au 1/10 en eau physiologique 10 p. 100 de DMSO
Congélation lente (30 mm + 4°C , 1 heure — 25°C , 1 heure — 40°C , — 79°C)
Conservation à -79°C
Décongélation rapide à 37°C .
- Pour les différentes souches les conservations suivantes ont été obtenues (seules sont rapportées ici les conservations d'au moins 30 jours).

B_{12} :	30 jours	(avec 5 et 10 p. 100 de DMSO)
	50 jours	(avec 10 p. 100 de DMSO)
	60 jours	(avec 5 et 10 p. 100 de DMSO)
	72 jours	(avec 5 et 10 p. 100 de DMSO)
	83 jours	(avec 10 p. 100 de DMSO)
	100 jours	(avec 5 et 10 p. 100 de DMSO)
	145 jours	(avec 10 p. 100 de DMSO)
	400 jours	(avec 10 p. 100 de DMSO)
	3 ans 1/2	(avec 5 et 10 p. 100 de DMSO)

Z_{34} :	39 jours	(avec 10 p. 100 de DMSO)
	50 jours	(avec 10 p. 100 de DMSO)
	62 jours	(avec 10 p. 100 de DMSO)
	72 jours	(avec 5 et 10 p. 100 de DMSO)
	83 jours	(avec 10 p. 100 de DMSO)
	100 jours	(avec 5 et 10 p. 100 de DMSO)
	145 jours	(avec 10 p. 100 de DMSO)
	400 jours	(avec 10 p. 100 de DMSO)
	4 ans	(avec 10 p. 100 de DMSO)
	5 ans 1/2	(avec 5 et 10 p. 100 de DMSO)

C_{36} :	70 jours	(avec 10 p. 100 de DMSO)
	83 jours	(avec 10 p. 100 de DMSO)

	92 jours	(avec 10 p. 100 de DMSO)
	357 jours	(avec 10 p. 100 de DMSO)
D_{36} :	70 jours	(avec 10 p. 100 de DMSO)
	83 jours	(avec 10 p. 100 de DMSO)

Certaines de ces conservations ont été obtenues plusieurs fois.

D'un point de vue pratique, les souches conservées à -79°C devraient être repassées sur souris tous les 6 ou 12 mois, car si lors de conservations longues (plusieurs années) nous obtenons la mort des souris avec la solution 10^{-1} en 10-12 jours, nous voyons avec l'allongement du temps de conservation s'abaisser la dose limite infectante, pour n'arriver quelquefois qu'à la dilution 10^{-2} qui soit infectante, et encore partiellement.

— Par exemple la souche Z_{34} après 4 ans à -79°C avec 10 p. 100 de DMSO :

10^{-1}	souris $\emptyset$	9 ^e jour	Toxo +
10^{-2}	souris $\emptyset$	11 ^e j. et VB	Toxo +
10^{-3}	souris		VB Toxo +

Cette chute du pouvoir infectant au cours de la conservation à -79°C est très généralement observée, lorsqu'on inocule des dilutions de matériel congelé, alors que la solution au 1/10 congelée et réinoculée ne démontre pas un allongement de la survie de la souris.

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Sans congélation	$\emptyset$ 5-8 j. Toxo +	$\emptyset$ 6-8 j. Toxo +	$\emptyset$ 6-7 j. Toxo +	$\emptyset$ 8 j. Toxo +	$\emptyset$ 8-10 j. Toxo +
Conservation : 2 h à -79°C	$\emptyset$ 8-10 j. Toxo +	$\emptyset$ 8-10 j. Toxo +	$\emptyset$ 8-10 j. Toxo +	$\emptyset$ 4-10 j. Toxo +	$\emptyset$ 10 j. VB Toxo +
Conservation : 62 j. à -79°C	$\emptyset$ 7-8 j. Toxo +	$\emptyset$ 8-9 j. Toxo +	$\emptyset$ 9 j. Toxo +	$\emptyset$ 9-11 j. Toxo +	$\emptyset$ 13 j. VB Toxo +
Conservation : 145 j. à -79°C	$\emptyset$ 7-8 j. Toxo +	$\emptyset$ 8-9 j. Toxo +	$\emptyset$ 10-11 j. Toxo +	$\emptyset$ 9 j. VB Toxo +	VB
Conservation : 400 j. à -79°C	$\emptyset$ 6-10 j. Toxo +	VB	$\emptyset$ 11 j. VB Toxo +	VB	VB

Congélation et conservation à -79°C en présence de DMSO sont partiellement létales, mais permettent néanmoins d'obtenir des conservations prolongées satisfaisantes puisqu'elles permettent de retrouver la souche sur souris dès le premier passage, et de retrouver les caractéristiques de cette souche dès le second passage.

Commentaires

Dans ces expériences, deux facteurs étaient très variables : les suspensions de toxoplasmes et les lots de souris.

L'exsudat péritonéal de souris contient une très grande quantité de toxoplasmes puisqu'il tue encore la souris à la dilution de 10^{-8} , mais numériquement, il est impossible de compter ces toxoplasmes. Dans un hématimètre, les toxoplasmes sont trop petits pour se déposer sur le support, ils restent en suspension et la mise au point sur plusieurs plans rend le compte entaché d'erreurs. En outre, un exsudat prélevé au 4^e jour de l'infection (on évite de prélever l'exsudat trop près de la mort de la souris pour que les bactéries de l'intestin ne passent pas dans l'exsudat), contient beaucoup de formes végétatives libres, mais une quantité sûrement plus importante de formes intracellulaires : ces cellules contiennent un nombre variable de toxoplasmes qu'il est impossible de compter. Aussi toutes les comparaisons ont été faites avec des exsudats mélangés constituant un stock homogène à partir duquel on prélevait les quantités nécessaires mises en présence de différents facteurs. Pour ces raisons, nous n'avons jamais comparé les résultats d'expériences faites à partir de stocks initiaux différents.

Un deuxième facteur variable et beaucoup moins contrôlable est représenté par les souris sur lesquelles nous faisons nos contrôles. Nous ne disposons que d'un élevage ordinaire de souris blanches dans lequel, en dehors de toute inoculation, nous constatons un pourcentage de mortalité variable suivant les lots et suivant les périodes de l'année. Dans certaines de nos expériences d'inoculation avec des dilutions d'exsudats nous constatons la mort d'une souris alors que ses congénères de même dilution ou de dilutions moins élevées, ne montraient aucun signe de maladie, et le contrôle ne nous permettait pas de retrouver des toxoplasmes. Ces mortalités étrangères à l'infection toxoplasmique étaient particulièrement élevées (aussi bien parmi les souris inoculées que parmi les souris non inoculées) durant les grosses chaleurs d'été : la pièce où nous conservons les souris ne dispose ni d'air filtré, ni d'air conditionné.

D'autre part, ces souris constituent une population hétérogène en particulier du point de vue résistance à l'infection : en effet, quatre souris inoculées avec la même dilution pouvaient montrer à partir du même jour des signes d'infection et qu'une survive et guérisse alors que les autres mouraient rapidement. De telles souris furent notées VB puisqu'ayant survécu 1 mois (temps d'évolution de chaque expérience) et qu'afin d'éviter la mort par infection bactérienne nous nous sommes abstenus de faire des ponctions.

Pour que ces mortalités aberrantes ne gênent pas les conclusions, nous avons inoculé au moins deux souris pour chaque dilution lors des comparaisons importantes qui nous entraînaient à en inoculer un grand nombre, au lieu des quatre souris que nous pensions primitivement inoculer, ce que nous avons fait chaque fois que cela était numériquement possible.

La culture des toxoplasmes chez la souris ne nous a pas permis de faire des comparaisons en fonction des variations de la DL_{50} . Il semble que la souris soit sensible au point que si on lui inocule une dose extrêmement faible de parasites, ceux-ci se développent sans que ce début de multiplication gêne la souris, celle-ci ne commence à montrer des signes pathologiques que lorsque le nombre de parasites dans l'organisme est suffisamment important. C'est d'ailleurs ce que l'on observe en culture cellulaire où le toxoplasme se multiplie à l'intérieur de la cellule sans apparemment la perturber et sans gêner les cellules non parasitées du reste de la culture qui continuent à présenter un aspect normal et à se diviser. La cellule finit par éclater à cause du trop grand nombre de parasites qu'elle contient, libérant ceux-ci qui vont parasiter d'autres cellules saines. Ce phénomène de tolérance des cellules est probablement dû au fait que les toxoplasmes ne sécrètent pas d'exotoxines. Chez la souris, grâce à ce mode de multiplication, nous observons un allongement de la survie. Pour nos comparaisons, il nous a semblé qu'ajouter aux variations de la dose limite infectante, les variations de survie des souris, nous permettrait de suivre d'une façon plus sensible les différences quelquefois minimes dans les conservations obtenues.

Pour la conservation des souches de toxoplasmes à -79°C , nous nous sommes servis de l'exsudat péritonéal de souris parce que c'est la technique la plus couramment utilisée, même si l'on fait parfois des passages à partir du cerveau d'une souris toxoplasmique afin d'espacer les inoculations, cette méthode, en raison de la difficulté du contrôle rapide de la richesse de l'organe, ne présente pas une sécurité suffisante.

Néanmoins, nous avons fait quelques essais de congélation à -79°C avec des organes de souris. Comme contrôle de la présence de toxoplasmes, nous avons réinoculé sans congélation des fragments de ces organes à des souris qui ont fait normalement une infection à toxoplasmes.

Avec la souche B_{12} , ni la moitié du cerveau, ni la rate, ni un lobe du foie, ni un poumon congelé, non fragmenté dans du DMSO pendant 34 jours à -79°C n'ont permis de retrouver la souche, ni même de tuer une seule des souris inoculées. Cet essai fait au début de nos travaux ne tenait pas compte de la toxicité du DMSO envers les toxoplasmes, aussi avons-nous refait un essai avec la souche D_{36} sur cerveau en présence de 10 p. 100 de DMSO. Le cerveau broyé comme il est d'usage pour de tels passages, fut mis en suspension, soit dans 2 ml d'eau physiologique à 10 p. 100 de DMSO, soit dans 4 ml. Après congélation lente, les ampoules furent conservées 123 jours à -79°C . Décongelées, les ampoules contenant un cerveau broyé dans 2 ml furent dilués au 1/4, les cerveaux broyés dans 4 ml furent dilués au 1/2 afin d'obtenir la dilution habituelle d'un cerveau dans 8 ml.

Cerveau congelé dans 2 ml : les souris moururent en 13, 19, 27 jours, une survécut. Chez aucune on ne put retrouver de toxoplasmes. Un passage aveugle fut fait avec le cerveau de la souris morte en 13 jours : toutes les souris survécurent et aucune ne se révéla porteuse de toxoplasmes.

Cerveau congelé dans 4 ml : les souris moururent en 6, 9, 15, 18 jours sans qu'on put identifier de toxoplasmes, le cerveau de la souris morte au 15^e jour ne transmit pas l'infection et toutes les souris survécurent.

Ce second échec pour un mode d'entretien des toxoplasmes qui nous paraît, en dehors de toute congélation, déjà aléatoire, nous fit abandonner les recherches en ce sens.

Nous avons étudié les caractéristiques et les meilleures conditions de conservation des toxoplasmes en présence de DMSO, mais des essais antérieurs avaient déjà été faits avec la glycérine qui est employée à 10 p. 100. Il ne semble pas que la conservation des toxoplasmes avec la glycérine ait donné d'aussi bons résultats qu'avec d'autres cellules, néanmoins, il nous a paru intéressant de comparer les conservations obtenues avec les deux substances protectrices.

Avec la souche B₁₂, un exsudat fut conservé des temps assez courts :

	+ DMSO 10 p. 100	+ Glycérine 10 p. 100
Sans congélation	0 7 j. Toxo +	0 8 j. Toxo +
1 h à — 79 °C	0 9 j. Toxo +	0 12 j. Toxo +
10 j. à — 79 °C	0 12 j. Toxo +	VB

Nous voyons qu'à la même concentration la glycérine paraît plus toxique que le DMSO, cet inconvénient avait d'ailleurs été déjà signalé.

Dans une autre série de conservations pendant des temps plus longs nous retrouvons de meilleurs résultats avec le DMSO.

	+ DMSO 5 p. 100	+ DMSO 10 p. 100	+ Glycérine 10 p. 100
72 j. à — 79 °C	0 7-8 j. Toxo +	0 8 j. Toxo +	0 8-9 j. Toxo +
100 j. à — 79 °C	0 8 j. Toxo +	0 7-8 j. Toxo +	0 11 j.-VB Toxo +
1 267 j. à — 79 °C	0 10-11 j. Toxo +	0 10-15 j. Toxo +	VB

Des conservations de longues durées comparant DMSO et glycérine ont été aussi faites avec la souche Z₃₄.

	+ DMSO 5 p. 100	+ DMSO 10 p. 100	+ Glycérine 10 p. 100
72 jours à — 79 °C	0 7 j. Toxo +	0 7-8 j. Toxo +	0 7-8 j. Toxo +
100 jours à — 79 °C	0 7 j. Toxo +	0 6 j. Toxo +	0 6-7 j. Toxo +
5 ans 1/2 à — 79 °C	0 9 j. VB Toxo +	0 9-10 j. Toxo +	0 10 j. VB Toxo +

Ici la conservation a été meilleure qu'avec la souche B₁₂ ; cependant la meilleure conservation revient à la dose 10 p. 100 de DMSO.

Donc les conservations avec la glycérine nous paraissent moins bonnes et plus irrégulières qu'avec le DMSO particulièrement à la dose 10 p. 100.

Enfin n'y aurait-il pas une meilleure conservation pour les toxoplasmes ? Nous avons eu l'occasion de faire un essai en azote liquide à — 195 °C. Voici les résultats obtenus à partir d'un exsudat de la souche B₁₂ auquel nous avons ajouté 10 p. 100 de DMSO :

sans congélation	souris 0 7 jours Toxo +
1 heure : — 79 °C	» 0 9 jours Toxo +
50 jours : — 79 °C	» 0 11 jours Toxo +
50 jours : — 195 °C	» 0 9 jours Toxo +

Il semble que la température de — 195 °C conserve le matériel dans l'état où l'a mené la congélation. Ce même exsudat conservé 50 jours à — 195 °C en présence de 10 p. 100 de glycérine tuait la souris en 11 jours à — 195 °C. Le matériel paraît mieux conservé avec le DMSO qu'avec la glycérine, mais une étude plus approfondie à cette température serait nécessaire.

Application aux Toxoplasmes se multipliant sur cellules en cultures

Bien que la conservation de *Toxoplasma gondii* ne se fasse généralement pas sur cellules en cultures, mais sur souris, il était intéressant pour nous d'adapter nos résultats à ces cultures qui permettent une étude cytologique plus facile particulièrement pour la microscopie électronique.

Nous avons pensé introduire le DMSO dans le milieu nutritif pour que la culture cellulaire soit parfaitement imprégnée de la substance protectrice. Lorsque nous avons introduit 10 p. 100 de DMSO (ou même seulement 5 p. 100) dans la suspension de fibroblastes en culture, la présence du produit a empêché la culture et entraîné la lyse des cellules. Bouroncle en 1965 avait d'ailleurs signalé l'inhibition de la croissance des cellules amniotiques FL par le DMSO. Lorsque nous avons introduit le DMSO à l'inoculation des tubes avec les toxoplasmes, nous avons aussi observé la lyse des cellules. Malinin et Perry en 1967 ont trouvé une action toxique du DMSO sur des cellules HeLa et depuis, Bouroncle et coll., 1970 et Greene et coll., 1970 ont publié que cette toxicité était plus marquée aux températures de 20-22 °C ou 37 °C qu'à + 4 °C. Pendant la multiplication de nos cultures à 37 °C, nous nous trouvions donc dans la zone de toxicité maximum.

Pratiquement des cultures formant un tapis continu (cultivant depuis 4 à 7 jours) sont inoculées avec des toxoplasmes dilués dans le milieu nutritif lors du renouvellement de ce dernier. Après 24 à 48 heures de multiplication, les parasites sont en majorité intracellulaires, ce qui nous a paru un facteur favorable pour la conservation, les parasites libres dans le milieu nutritif prenant souvent un aspect arrondi qui correspond peut-être à une forme de résistance ou une forme de souffrance hors des cellules.

Le DMSO fut dès lors ajouté au milieu à la dose de 10 p. 100, un contact de 30 mn à 37 °C précédant la congélation lente jusqu'à — 79 °C. Afin de réduire le volume du matériel à congeler, les lamelles des cultures étaient transvasées avec ou sans le milieu nutritif dans des tubes de Kahn stériles. Il s'est avéré que ces manipulations étaient dangereuses (les risques de contamination étant difficiles à éliminer) et ne permettaient pas, étant donnée leur durée, une stérilité absolue. Grâce à un conservateur à neige carbonique de plus grand volume, les tubes de culture purent être congelés. L'adjonction de DMSO se fait à la dilution convenable, directement dans le milieu nutritif riche en parasites libres. Deux essais ont été faits : un où les tubes étaient congelés avec leur lamelle et le milieu nutritif, l'autre où après un contact de 30 mn le milieu nutritif était prélevé et seules les cultures de fibroblastes sur les lamelles étaient congelées. Pour les deux séries, les tubes bouchés au caoutchouc étaient placés dans du coton cardé à l'intérieur d'un panier métallique, avant de pratiquer la congélation lente.

Dans les deux cas de bons résultats ont été obtenus, mais l'aspect des parasites est plus net sur les lamelles congelées sans milieu.

Les cultures sur lamelles sont décongelées en plongeant les tubes les contenant dans un bain-marie à 37 °C. Avec une lame de rasoir stérile les cellules sont prélevées sur les lamelles et mises dans un broyeur de Durand, après broyage et mise en suspension en milieu nutritif, des contrôles furent faits sur cultures cellulaires et sur souris.

Sur cultures cellulaires, la pauvreté de l'inoculum d'une part, la lyse des cellules en culture intervenant avant que les parasites se soient suffisamment développés d'autre part, rendaient les contrôles aléatoires, mais nous avons cependant retrouvé des toxoplasmes présentant des figures de divisions. Sur souris par voie péritonéale, les contrôles

furent plus faciles d'autant que la concentration de l'inoculum en cellules congelées était possible, alors que sur culture cellulaire cette concentration entraîne la lyse de la culture.

Il est donc possible de conserver à -79°C des toxoplasmes sur cellules en culture en présence de 10 p. 100 de DMSO, mais ce mode de conservation est délicat pour le manipulateur qui risque de se contaminer et de contaminer les cultures en prélevant la couche cellulaire après congélation. Elle ne paraît pas non plus idéale pour le parasite, celui-ci en quantité assez faible dans les cellules, ne retrouvant pas un milieu particulièrement sensible avec les cultures cellulaires ; si l'épreuve sur souris nous a permis de contrôler les congélations, il n'y a pas intérêt à congeler les toxoplasmes sur cellules alors qu'il faudrait ensuite enrichir la souche sur souris.

C'est pour l'étude cytologique que nous avons eu recours à ce mode de conservation.

Une Bibliographie générale sera publiée à la fin de ce travail.

ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Tome 49

1974

N° 2

Annales de Parasitologie (Paris), 1974, t. 49, n° 2, pp. 133-158

MÉMOIRES ORIGINAUX

Conservation aux basses températures de *Toxoplasma gondii*

Nicolle et Manceaux, 1909

- Action du diméthyl-sulfoxyde -

par N. DUMAS

Institut Pasteur, Laboratoire des Rickettsioses
28, rue du Docteur-Roux, B.P. 520, F 75724 Paris Cedex 15

II. — ETUDE CYTOLOGIQUE DU PARASITE CONGELE AVEC OU SANS SUBSTANCES PROTECTRICES.

Résumé.

Quelles sont les lésions morphologiques dues à la congélation de *Toxoplasma gondii* et quel est l'aspect d'un toxoplasme protégé par le DMSO ?

L'observation au microscope à immersion des toxoplasmes donne des résultats succincts n'expliquant pas des résultats aussi radicalement différents que la survie ou la mort des parasites. A l'état frais en contraste de phase, l'exsudat péritonéal de souris toxoplasmique, observé lors de mauvaises conservations, montre une vacuolisation du cytoplasme, l'effacement des contours de la membrane et du noyau. Des aspects normaux ou proches de la normale sont obtenus avec 5 ou 10 p. 100 de DMSO ajoutés à de l'exsudat dilué au 1/10.

Après fixation, seule la coloration de May-Grünwald-Giemsa peut s'appliquer valablement sur ce matériel ; lors de conservation défavorable (en l'absence ou avec du DMSO introduit dans de l'exsudat non dilué) on voit des parasites gonflés, au cytoplasme pâle et même diffus, une substance nucléaire hétérogène. Les colorations de Feulgen et de May-Grünwald-Giemsa sur des toxoplasmes cultivés en cellules en culture mettent en évidence des lésions importantes du noyau avec des congélations défectueuses.

La microscopie électronique en pénétrant jusqu'à la structure fine pouvait mettre en lumière des lésions plus infimes et peut-être plus vitales du toxoplasme. En l'absence de DMSO, on constate des lésions profondes du cytoplasme, du noyau et de leurs structures, mais une bonne conservation de l'architecture rigide du parasite. Avec 5 p. 100 de DMSO, on observe des lésions, en particulier la vacuolisation du cytoplasme et c'est avec 10 p. 100 de DMSO qu'on obtient des aspects révélant de bonnes conservations.

Summary.

What is the morphological damage attributable to freezing *Toxoplasma gondii* and what is the state of *Toxoplasma* protected by DMSO ?

By immersion microscopy, we obtained broad results which did not show radical differences between surviving and dying parasites. When observed in the living state by phase contrast, the peritoneal exudate of toxoplasmic mice, observed during incorrect preservation, shows cytoplasmic vacuolisation and disappearance of the cell and nucleus walls. Normal or near normal results are obtained with 5 % or 10 % of DMSO added to the exudate diluted to 1/10. After fixation, only May-Grünwald-Giemsa staining can be properly used on this material and with incorrect preservation (without or with DMSO added to the undiluted exudate) distended parasites having faint cytoplasm even with shadowy outlines and a heterogeneous nuclear substance can be seen. Under the same conditions, Feulgen and May-Grünwald-Giemsa staining, on *Toxoplasma* growing in cell culture clearly shows intensive damage to the nucleus with defective freezing.

Using the electron microscope down to fine structure, we observed minute and perhaps more serious damage of *Toxoplasma*. Without DMSO we observed more intensive damage of cytoplasm and nucleus and of their structures, but a good preservation of the hard framework of the parasite. With 5 % DMSO, there was still damage, in particular vacuolisation of the cytoplasm and it is only with 10 % DMSO that results showing good preservation are obtained.

Techniques

A. — L'état frais.

EN CONTRASTE DE PHASE.

Cet examen microscopique vital a l'avantage de n'entraîner aucune modification du matériel, à condition bien entendu que les observations soient faites sur du matériel prélevé ou décongelé juste avant l'examen et que cet examen entre lame et lamelle sous le microscope soit d'assez courte durée (15 à 20 mn maximum).

Après fixation

EN MICROSCOPIE OPTIQUE.

Pour faire apparaître les toxoplasmes, nous avons eu recours à différentes colorations. Les meilleures colorations cytologiques sont plutôt applicables à des coupes d'organes, mais on a vu (1^{re} partie) que la congélation d'organes était difficilement contrôlable, aussi avons-nous essayé nos diverses colorations sur frottis d'exsudats péritonéaux et sur lamelles de fibroblastes d'embryon de poulet. Pour les frottis d'exsudats, seule la coloration de May-Grünwald Giemsa (classiquement utilisée d'ailleurs) peut-être appliquée, les autres techniques par leur nature et malgré diverses fixations, ne laisseraient pas ou trop peu de matériel sur la lame porte-objet.

Nous avons eu recours aux techniques classiques pour les colorations de May-Grünwald-Giemsa (fixation à l'alcool méthylique), d'hémalum-éosine (fixation au Kahle), de vert de méthyle pyronine (fixation au Carnoy).

Pour la coloration de Feulgen, la technique de coloration classique (avec fixation au Kahle), ne nous ayant pas donné de bons résultats, nous avons essayé diverses modifications. Deux types de fixation des cellules sur lamelles ont été appliqués : le Kahle agissant, soit sur des lamelles humides (selon la technique classique), soit sur des lamelles ayant subi une légère dessiccation à l'air. Après l'hydrolyse chlorhydrique, le réactif de Schiff a été laissé 1 h 1/2, 3 heures ou 4 heures ; ensuite on a coloré à l'éosine seulement certaines lames.

Les résultats sont consignés dans le tableau ci-après :

Schiff.	Fixation humide		Fixation sèche	
	Avec éosine	Sans éosine	Avec éosine	Sans éosine
1 h 1/2	C* : N* pourpre Cy* rose	C : N pourpre	C : N pourpre Cy rose	C : N gris
	T* : rose	T : peu visible	T : rose, centre légèrement pourpre	T : peu visible
3 h ..	C : N pourpre, bien visible	C : N pourpre	C : N visible Cy rose	C : N visible
	T : peu visible	T : pas visible	T : rose, N pas visible	T : N très légèrement visible
4 h ..	C : N pourpre Cy rose	C : N pourpre	C : N violet Cy rose	C : N pourpre
	T : très peu visible	T : pas visible	T : rose, pas de N visible	T : pas visible

(*) C = cellules ; N = noyau ; T = toxoplasmes ; Cy = cytoplasme.

Pour voir les toxoplasmes avec leurs noyaux, il faut donc fixer au Kahle une lamelle ayant subi une légère dessiccation préalable, et ne prolonger le contact avec le réactif de Schiff qu'une heure et demie, c'est ainsi que l'ADN des toxoplasmes, préalablement soumis à une hydrolyse ménagée, se colore légèrement au contact du réactif de Schiff. Pour faciliter la lecture, les corps nucléaires des toxoplasmes étant petits, il est préférable de passer rapidement la lame à l'éosine en fin de coloration : ainsi le cytoplasme apparaît en rose et cela permet de reconnaître plus facilement nos parasites. On atténue légèrement la coloration des noyaux par la coloration à l'éosine, par exemple les noyaux des toxoplasmes très légèrement visibles après un contact de 3 heures au Schiff, paraissent masqués par l'éosine.

Les meilleurs résultats ont été obtenus en séchant les lamelles, en les laissant 1 h 1/2 dans le réactif de Schiff et en les recolorant à l'éosine.

EN ULTRAMICROSCOPIE.

Le tapis cellulaire, après avoir été détaché de la lamelle avec une lame de rasoir, subit la double fixation glutaraldéhyde-acide osmique et fut inclus dans l'epon. Les coupes, faites soit à l'ultra-microtome manuel, soit à l'ultra-microtome de Reichert (1), furent contrastées à l'acétate d'uranyle alcoolique ou aqueux suivi ou non de citrate de plomb.

Le matériel fut examiné avec un microscope électronique Hitachi HV 11 A (2).

Résultats

Etat frais en contraste de phase.

En microscopie optique, ce mode d'examen nous a paru faire apparaître le mieux les différentes modifications dues à la congélation des toxoplasmes.

Dès que nous avons constaté la rapidité et la simplicité avec lesquelles nous pouvions par examen en contraste de phase évaluer les résultats de nos congélations, nous avons utilisé ce type d'observation après chaque décongélation. Pour le travail photographique reproduit ici, nous avons congelé lentement jusqu'à -79°C , de l'exsudat péritonéal de souris inoculées avec la souche B₁₂ de toxoplasmes : cet exsudat était réparti en six séries d'ampoules :

Série 1 : exsudat pur

Série 2 : exsudat dilué au 1/10

Série 3 : exsudat pur + DMSO 5 p. 100

Série 4 : exsudat dilué au 1/10 + DMSO 5 p. 100

(1) L'ultra-microtome de Reichert a été mis à notre disposition par le Prof. Esquai, Sce de Microscopie Electronique, laboratoire d'Evolution des Etres Organisés, Paris.

(2) C'est grâce à l'extrême amabilité du Dr J.-M. Jadin, Clinique St-Raphaël, Louvain (Belgique), que nous devons d'avoir pu utiliser plusieurs jours, dans d'excellentes conditions, cet appareil.

Série 5 : exsudat pur + DMSO 10 p. 100

Série 6 : exsudat dilué au 1/10 + DMSO 10 p. 100.

Ces ampoules ont été maintenues 7 jours à -79°C , puis décongelées rapidement au bain-marie à 37°C , avant les prises de vues microphotographiques. Un témoin constitué par de l'exsudat frais juste prélevé sur une souris inoculée avec la souche B₁₂ a été photographié pour servir de référence.

Sur les formes libres isolées dans le milieu l'observation est plus facile et les différences plus visibles (Pl. I, fig. 4 à 10).

Lors de la congélation sans substance protectrice, nous voyons les parasites se gonfler, s'arrondir, se vacuoliser, ce dernier phénomène est d'autant plus net que l'exsudat est dilué, la dilution en eau physiologique doit probablement agir d'une façon doublement néfaste, par apport d'eau et par dilution des substances protectrices de l'exsudat : ce phénomène a déjà été signalé par de nombreux auteurs et retrouvé par nous-mêmes lors de nos essais comparatifs sur animaux. Dans l'exsudat non dilué, les vacuoles sont moins importantes et si la congélation a été de durée assez courte, nous retrouvons de 1 à 10 p. 100 de formes non vacuolisées, presque normales (généralement plus rondes que les formes typiques), ce phénomène ne se retrouve pratiquement plus au-delà d'un mois à -79°C .

Dès que l'on ajoute du DMSO, le phénomène s'inverse : ce sont les exsudats dilués au 1/10 qui présentent les formes les plus proches de la normale : le DMSO plus soluble dans l'eau que dans l'exsudat serait-il en contact d'une façon plus homogène et plus directe avec le parasite et par là sa pénétration en serait-elle facilitée ?

Avec 5 ou 10 p. 100 de DMSO ajouté à l'exsudat dilué au 1/10, la majorité des toxoplasmes est de formes allongées, non vacuolisées, c'est avec 5 p. 100 de DMSO que se retrouvent les quelques formes les plus semblables au témoin (en particulier noyau visible). Cette observation traduit peut-être la légère toxicité du DMSO sur les toxoplasmes, déjà observée au cours de ce travail, cette toxicité étant plus marquée au taux de 10 p. 100.

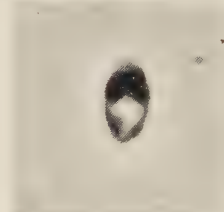
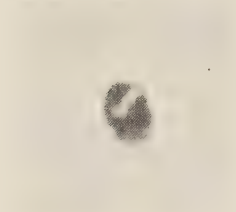
Les résultats sont différents lorsqu'on ajoute du DMSO à l'exsudat non dilué. Avec 5 p. 100 de DMSO, nous ne retrouvons que peu de formes à vacuolisation nette, mais peu aussi de formes allongées, les toxoplasmes paraissent en majorité légèrement arrondis et on peut distinguer des micro-vacuoles. Avec 10 p. 100 de DMSO, les parasites gardent une forme plus allongée et les micro-vacuoles ont disparu. Le DMSO doit mal se diluer dans l'exsudat épais des souris atteintes de toxoplasmose, exsudat qui, pur, a tendance à coaguler très rapidement (nous avons cependant toujours mélangé soigneusement le DMSO à l'exsudat, en aspirant et refoulant plusieurs fois le mélange avec une seringue munie d'une aiguille fine).

Morphologiquement la meilleure conservation des formes isolées est obtenue avec l'exsudat dilué au 1/10 auquel on ajoute le DMSO.

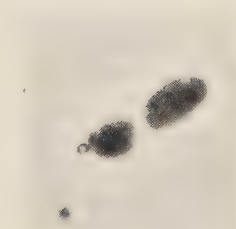
Mais si un exsudat péritonéal à un stade avancé de l'infection ne contient pratiquement plus de toxoplasmes intracellulaires, il contient beaucoup de toxoplasmes en amas, soit groupés entre eux, soit groupés sur des débris cellulaires. Sur ces amas, les résultats de la congélation sont légèrement différents (Pl. II, fig. 11 à 17):



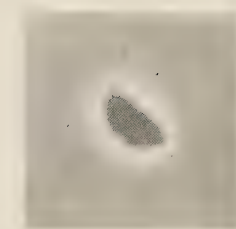
Témoïn sans congélation

Exsudat congelé non diluéExsudat congelé dilué au $\frac{1}{10}$ 

sans substance protectrice



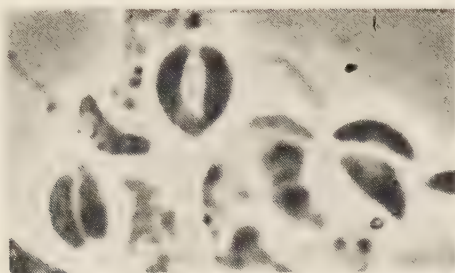
+ DMSO 5 p 100



+ DMSO 10 p 100

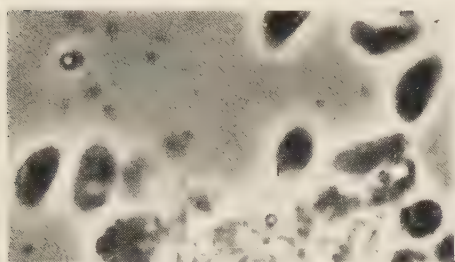
PLANCHE I

FIG. 4 à 10. — Formes libres isolées (contraste de phase) $\times 1575$



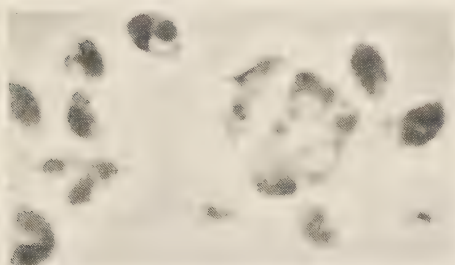
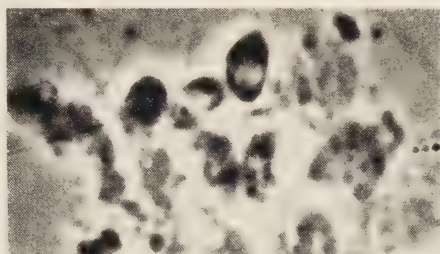
Témoïn sans congélation

Exsudat congelé non dilué

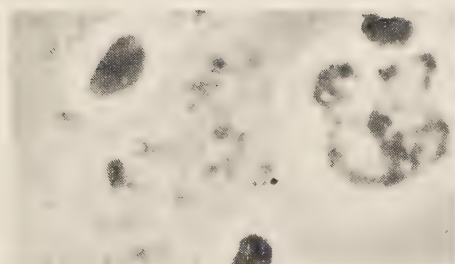
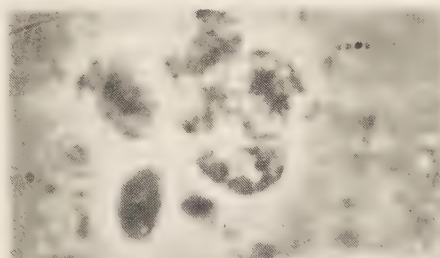


sans substance protectrice

Exsudat congelé dilué au $\frac{1}{10}$



+DMSO 5 p 100



+DMSO 10p100

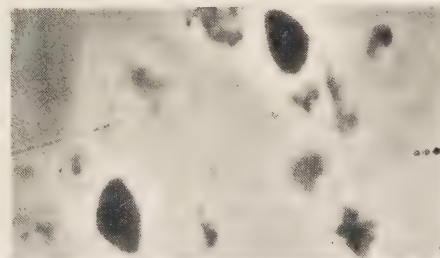


PLANCHE II

FIG. 11 à 17. — Formes libres en amas (contraste de phase) $\times 1575$

Dans le témoin, nous constatons que les toxoplasmes des amas sont plus polymorphes : formes légèrement arrondies à côté de formes typiques, noyau moins nettement visible à l'intérieur du parasite et surtout nombreux parasites ayant déjà des vacuoles (c'est cette raison qui fait écarter ces formes non isolées lors du comptage des parasites dans le test sérologique de lyse des toxoplasmes).

En l'absence de substance protectrice les lésions dues à la congélation sont profondes et là aussi beaucoup plus nettes avec la dilution au 1/10 de l'exsudat où la vacuolisation et le gonflement des toxoplasmes sont très nets.

Avec l'exsudat non dilué et 5 p. 100 de DMSO, les résultats ne paraissent guère meilleurs que sans DMSO, il faut 10 p. 100 de DMSO pour voir le nombre des formes vacuolisées reculer nettement, mais les formes restent légèrement arrondies. La difficulté de pénétration de DMSO au sein de l'exsudat non dilué est encore plus net au niveau des amas que sur les formes libres.

Pratiquement on observe dans les amas, quelques formes assez allongées, mais on ne trouve aucune forme normale ou proche de la normale comme avec les formes isolées.

Grâce à ces deux séries d'observations, en microscopie à contraste de phase, il semble qu'on puisse ajouter aux observations faites sur l'animal que la pénétration du DMSO dans le toxoplasme soit facilitée par la dilution de l'exsudat, mais aussi qu'il importe d'avoir le maximum de formes libres isolées : pour cela il faut prélever l'exsudat péritonéal des souris le plus tard possible sur la souris infectée ; pour notre souche B₁₂ (et la majorité des souches à virulence élevée pour la souris) 4 jours après l'inoculation paraît être le plus favorable, évitant ainsi les infections bactériennes qui interviennent souvent peu avant la mort des souris 5-6 jours après l'inoculation.

Pour chiffrer ces observations morphologiques, nous avons fait *des comptages* des diverses formes contenues dans des exsudats congelés selon les modalités déjà décrites et conservés plus ou moins longtemps à — 79 °C.

Les toxoplasmes congelés furent classés en trois catégories « les normaux », « les lysés » et « les abîmés ». Dans cette dernière catégorie sont classés tous les parasites présentant un aspect anormal allant de la simple augmentation de volume à l'aspect granuleux, stade précédent probablement la lyse, cette dernière faisant apparaître le toxoplasme avec de grandes vacuoles. Ces aspects correspondent peut-être à des toxoplasmes encore viables jusqu'à des toxoplasmes pratiquement « morts ».

La comparaison porte sur un exsudat congelé soit pur, soit dilué au 1/10 avec adjonction de 5 ou 10 p. 100 de DMSO. Les ampoules ont été décongelées après 24 heures, 10 jours, 60 jours et 100 jours de conservation à — 79 °C. Les résultats du tableau ci-après ont permis d'obtenir les courbes de la Pl. III, fig. 18-21.

Sur ces courbes, que l'on considère les toxoplasmes « lysés » ou les « normaux » il ressort que le DMSO agit plus efficacement lorsque l'exsudat est dilué au 1/10. La protection est-elle meilleure avec 5 ou 10 p. 100 de DMSO ? Si l'on pense que la courbe de toxoplasmes « lysés » traduit mieux la qualité de la conservation, elle est légèrement inférieure avec 10 p. 100 de DMSO. Au cours des dix premiers jours de conservation, on constate une chute plus importante du nombre des toxoplasmes « nor-

			24 h	10 j.	60 j.	100 j.
Exsudat pur	+ DMSO 5 p. 100	N*	57 p. 100	23 p. 100	10 p. 100	8 p. 100
		A*	18 p. 100	62 p. 100	50 p. 100	53 p. 100
		L*	25 p. 100	15 p. 100	40 p. 100	39 p. 100
	+ DMSO 10 p. 100	N	63 p. 100	16 p. 100	9 p. 100	5 p. 100
		A	16 p. 100	45 p. 100	58 p. 100	44 p. 100
		L	21 p. 100	39 p. 100	33 p. 100	51 p. 100
Exsudat au 1/10	+ DMSO 5 p. 100	N	53 p. 100	29 p. 100	32 p. 100	38 p. 100
		A	25 p. 100	46 p. 100	45 p. 100	39 p. 100
		L	22 p. 100	25 p. 100	23 p. 100	23 p. 100
	+ DMSO 10 p. 100	N	57 p. 100	40 p. 100	32 p. 100	33 p. 100
		A	29 p. 100	40 p. 100	50 p. 100	47 p. 100
		L	14 p. 100	20 p. 100	18 p. 100	20 p. 100

* N = toxoplasmes normaux, A = t. abîmés, L = t. lysés.

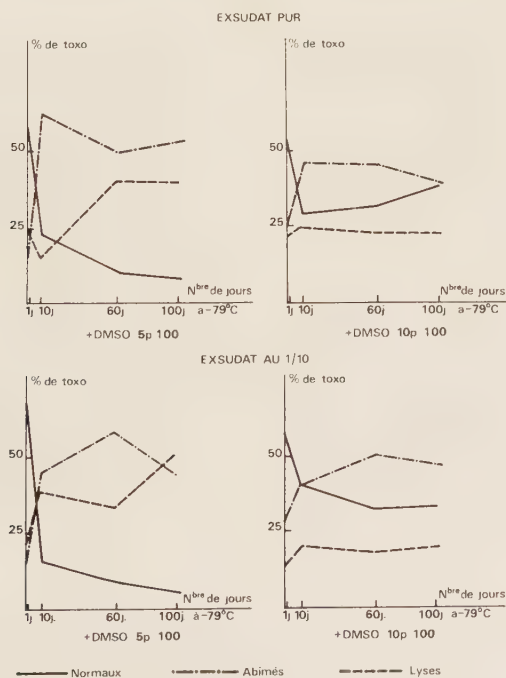


PLANCHE III

FIG. 18 et 21. — Comptage en contraste de phase après congélation

maux » avec 5 p. 100 de DMSO, ce qui correspond peut-être à une moins bonne protection contre les méfaits de la congélation, mais l'abaissement du nombre des toxoplasmes « normaux » se poursuit avec 10 p. 100 de DMSO : est-ce l'action toxique de DMSO, plus sensible à 10 p. 100, qui entre en jeu lors de la conservation ?

Le liquide nutritif de tubes de cultures cellulaires parasité par *T. gondii*, dans les mêmes conditions de décongélations et de conservation, montre les mêmes aspects en contraste de phase.

Après fixation et colorations, en microscopie photonique :

Sur Frottis d'exsudat péritonéal :

La plupart des colorations sont plutôt applicables aux coupes ou aux cultures cellulaires comme l'hémalun-éosine, le vert de méthyle-pyronine, le Feulgen : les toxoplasmes n'étant pas nettement colorés, il est impossible de voir des différences entre parasites congelés et parasites non congelés. Les colorations utilisées couramment sur frottis comme le Macchiavello et sa variante, le Stamp ne donnent pas non plus de bons résultats sur les toxoplasmes. La coloration de May-Grünwald-Giemsa permet de voir, bien colorés, les toxoplasmes isolés avec leur cytoplasme bleu pâle contenant un corps nucléaire, violet foncé (Pl. IV, fig. 22).

Lorsque l'exsudat est congelé sans DMSO (Pl. IV, fig. 23 et 24) le cytoplasme est peu ou pas visible surtout pour l'exsudat dilué au 1/10, les noyaux sont aisément observables, mais déformés. La durée de conservation est particulièrement importante avec l'exsudat non dilué qui après quelques heures présente encore de nombreuses formes très reconnaissables alors qu'après 4 jours, l'aspect est identique que l'exsudat soit dilué ou non.

Avec 5 ou 10 p. 100 de DMSO (Pl. IV, fig. 25 à 28) introduit dans l'exsudat non dilué, les contours du cytoplasme sont estompés, les granulations violet foncé du noyau paraissent disposées à la périphérie juste sous la membrane nucléaire.

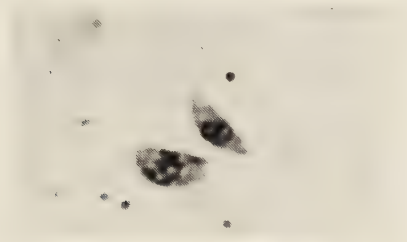
Lorsque les mêmes proportions de DMSO sont introduites dans l'exsudat dilué au 1/10, on obtient des aspects proches du témoin non congelé. La présence de DMSO dans le produit étalé ne permet pas des colorations fines : les toxoplasmes paraissent empâtés par le colorant qui se fixe peut-être plus intensément en raison de la présence de DMSO. Généralement avec 5 p. 100 de DMSO, le cytoplasme est quelquefois vacuolisé, mais l'aspect général est normal, comme avec 10 p. 100 de DMSO.

La May-Grünwald-Giemsa fait apparaître, comme l'observation en contraste de phase, une meilleure conservation de l'aspect des parasites congelés dans de l'exsudat dilué au 1/10 avec 5 ou mieux 10 p. 100 de DMSO.

Sur lamelles de cellules en culture

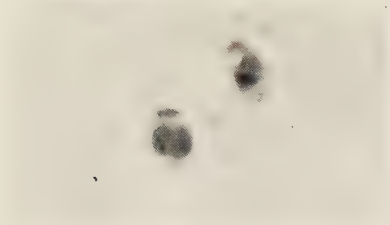
Hémalun-Eosine

Les toxoplasmes apparaissent rose très pâle, mais quelles que soient les modalités de congélation et les résultats de la conservation, l'aspect paraît en général normal ou du moins semblable au témoin non congelé ; ces résultats furent retrouvés aussi bien pour la souche B₁₂ que pour la souche Z₃₄.

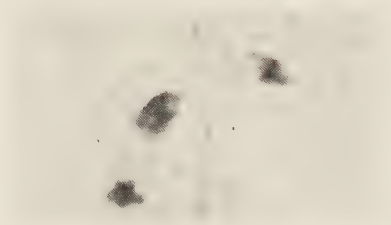


Témoin sans congélation

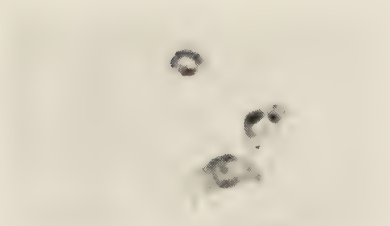
Exsudat congelé non dilué



Exsudat congelé dilué au $\frac{1}{10}$



sans substance protectrice



+ DMSO 5 p.100



+ DMSO 10 p.100



PLANCHE IV

FIG. 22 à 28. — Formes libres isolées (May-Grünwald Giemsa) $\times 1575$

May-Grünwald-Giemsa

Sur les cultures non soumises à la congélation, les toxoplasmes sont arqués, assez fins, leur cytoplasme est coloré en bleu et leur noyau en violet (Pl. V, fig. 29).

Lorsque les tubes sont congelés avec ou sans liquide nutritif, le cytoplasme des parasites n'est plus visible, les noyaux sont augmentés de volume et présentent un aspect piqueté réticulé. En présence de liquide nutritif, la coloration violette des noyaux est plus pâle que lorsqu'on a enlevé le liquide (Pl. V, fig. 30 et 31).

Avec adjonction de 5 p. 100 de DMSO dans le liquide nutritif, les toxoplasmes ont un aspect gonflé et le noyau, lui aussi augmenté de volume, paraît moins dense. Si après 30 mn de contact avec le liquide nutritif contenant 5 p. 100 de DMSO, on enlève ce liquide avant la congélation, des toxoplasmes ont un aspect normal, mais on trouve des plages de toxoplasmes qui ont l'aspect gonflé et le noyau abîmé (Pl. V, fig. 32 et 33).

Lorsqu'on ajoute 10 p. 100 de DMSO, les toxoplasmes présentent après congélation sans liquide nutritif un aspect normal en particulier avec le cytoplasme bien coloré faisant apparaître nettement le contenu du parasite. C'est ce caractère qui n'apparaît pas toujours lorsque les cultures sont congelées avec le milieu nutritif où le contour du parasite est souvent mal délimité (Pl. V, fig. 34 et 35).

Avec 5 p. 100 de DMSO et 30 mn de contact, la protection semble insuffisante, lorsqu'on laisse le liquide, l'excès d'eau paraît masquer le pouvoir protecteur de 5 p. 100 de DMSO puisqu'on obtient des aspects proches de ceux obtenus sans DMSO. Avec 10 p. 100 de DMSO, les toxoplasmes ne semblent pas souffrir de la congélation particulièrement en l'absence de liquide nutritif.

Ces constatations ont été faites sur des cultures âgées où les cellules étaient à un état de lyse avancée due à l'abondante multiplication des parasites: ce sont ces cultures qui ont parallèlement fourni le matériel en vue de l'étude au microscope électronique.

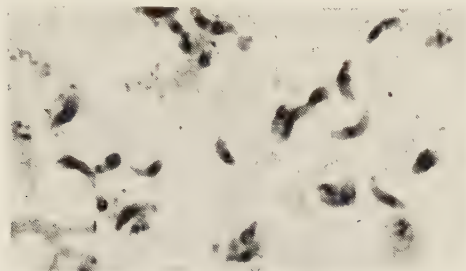
Les mêmes observations furent faites sur des cultures jeunes, avec plus de netteté peut-être, car les toxoplasmes ont un aspect meilleur lorsqu'ils sont intracellulaires. Avec ces cultures jeunes nous avons admis la supériorité de la dose 10 p. 100 de DMSO, nous avons comparé les aspects avec ou sans milieu nutritif (Pl. VI, fig. 36 à 40).

Cette coloration fait apparaître la nécessité de congeler les cultures cellulaires en l'absence du milieu nutritif, après un temps de contact cellules-milieu nutritif avec DMSO que nous avons limité à 30 mn en raison de la rapidité de pénétration de cette substance protectrice; elle nous montre, dans certaines conditions de congélations, des lésions cytoplasmiques profondes accompagnées d'apparentes modifications du noyau du parasite, aussi avons-nous essayé des colorations spécifiques de cette importante structure cellulaire.

Vert de méthyle pyronine

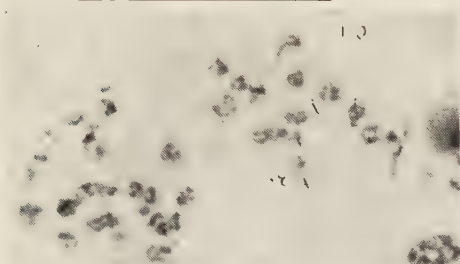
Les toxoplasmes non congelés présentent un cytoplasme rose, mais le corps central nucléaire est toujours mal coloré et sa teinte gris verdâtre est peu visible. Les résultats sont identiques que la fixation au Carnoy, après lavage à l'eau physiologique, soit faite sur lamelles humides ou sur lamelles sèches et en faisant agir la solution de vert de méthyle-pyronine 7 ou 18 heures.

Lorsqu'on congèle les toxoplasmes (souche B₁₂), sans substances protectrices, quelques parasites donnent l'impression d'une lyse, mais d'autres ont leur corps central gris-vert comme le témoin. Avec 5 p. 100 de DMSO, les toxoplasmes sont presque homogènes, roses, mais

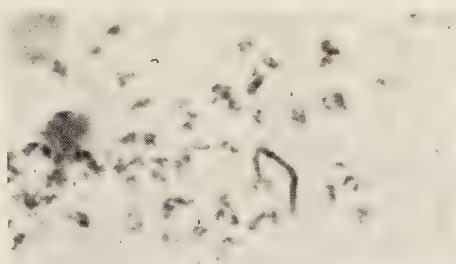


Témoin sans congélation

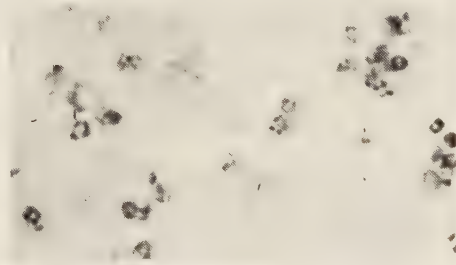
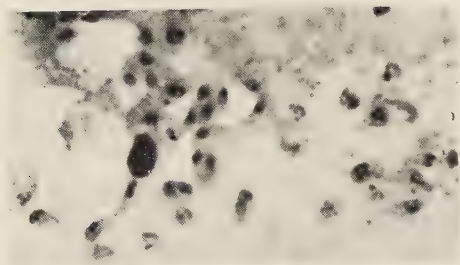
Congélation sans milieu



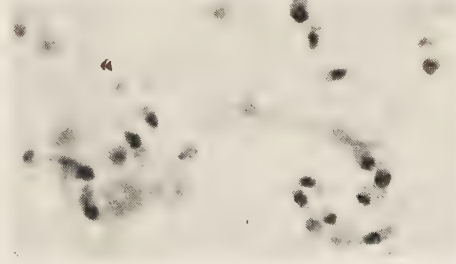
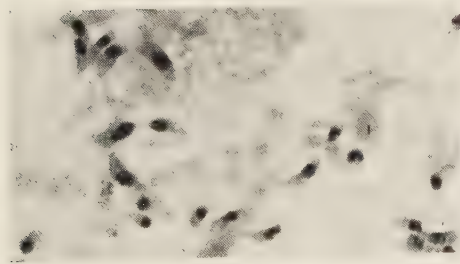
Congélation avec milieu



sans substance protectrice



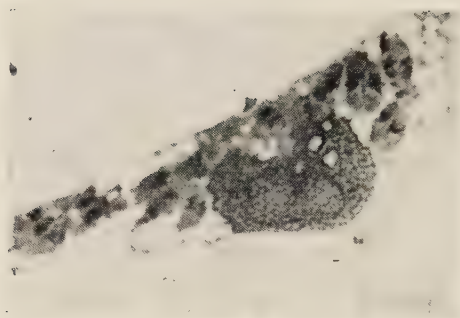
+ DMSO 5 p 100



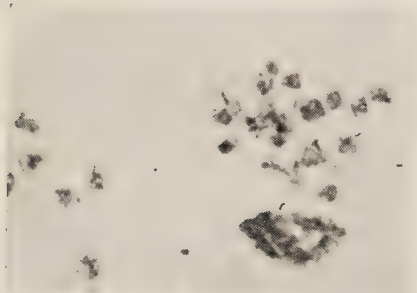
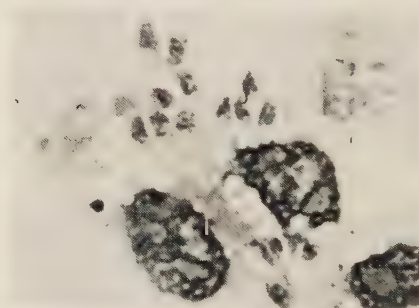
+ DMSO 10 p 100

PLANCHE V

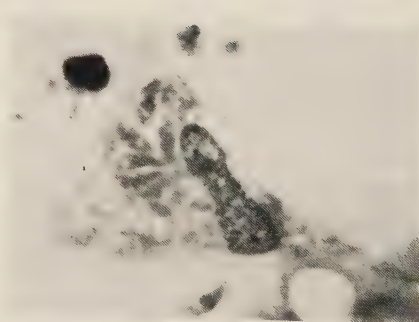
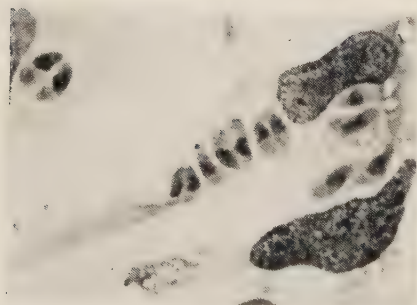
FIG. 29 à 35. — Cultures cellulaires âgées (May-Grünwald Giemsa) $\times 1050$



Témoin sans congélation

Congélation sans milieuCongélation avec milieu

Sans substance protectrice



+ DMSO 10 p 100

PLANCHE VI

FIG. 36 à 40. — Cultures cellulaires jeunes (May-Grünwald Giemsa) $\times 1050$

bien visibles, et le corps central est si pâle qu'il est à peine discernable. Avec 10 p. 100 de DMSO, même aspect rose, mais le corps central est plus visible ; par contre avec 10 p. 100 de glycérine, ce corps central est peu visible.

Avec la souche Z_{34} on retrouve les mêmes aspects avec cependant des résultats un peu différents avec 10 p. 100 de glycérine : aspects lésés de certains toxoplasmes alors que d'autres semblent bien conservés avec des corps centraux bien visibles.

Nous n'avons pas appliqué le test de Brachet à la ribonucléase, puisque nous ne cherchions à voir que les différentes modifications d'une même cellule, soumise à des traitements divers.

Feulgen

L'aspect d'une culture de cellules parasitées avec des toxoplasmes colorés par cette technique est assez difficile à interpréter et il faut que les toxoplasmes soient très nombreux pour les distinguer à coup sûr, d'autant qu'ils ne se colorent pas toujours très bien.

D'après l'étude relatée dans la partie « TECHNIQUES » (2^e partie), les lamelles légèrement desséchées ont été fixées au Kahle, laissées 1 h 30 dans le Schiff et recolorées à l'éosine.

Avec la souche B_{12} , les toxoplasmes congelés ou non montrent des noyaux pourpres, pâles, mais visibles ; avec le DMSO à 5 p. 100 après congélation, les noyaux sont mauve, assez pâle ; avec 10 p. 100 de DMSO, ils sont mauve, mais plus visibles, et avec 10 p. 100 de glycérine on retrouve le même aspect qu'avec le DMSO à 5 p. 100. Avec la souche Z_{34} , on retrouve sensiblement les mêmes résultats.

En fait, toutes ces colorations, sauf le May-Grünwald-Giemsa (et en faisant les réserves dues au mode de fixation) ne nous ont pas apporté de critère probant en relation avec la conservation ou la non conservation des toxoplasmes congelés avec ou sans substances protectrices.

Après fixation et coloration en microscopie électronique

Vacuolisation du cytoplasme observé en contraste de phase et au May-Grünwald-Giemsa, lésions du noyau perçues avec cette coloration, correspondent à des lésions profondes, voir létales. Pour pénétrer plus avant au niveau des structures fines de la cellule, seule la microscopie électronique pouvait nous y aider.

Sur lamelles de cellules en culture

Les toxoplasmes congelés sans substance protectrice ont généralement leur forme très altérée, particulièrement lorsque la congélation est faite en présence du liquide nutritif (fig. 42, 43 et 45) (3), dans ces dernières conditions, la membrane du parasite est quelquefois largement rompue et le cytoplasme s'échappe par cette brèche (fig. 42 et 44) alors qu'en l'absence de liquide nutritif les déchirures de la membrane sont beaucoup plus discrètes. Lors de la congélation avec le liquide nutritif, les structures paraissent profondément altérées, souvent difficilement reconnaissables ; le noyau (N) et son nucléole (Nu) sont

(3) Légende adoptée pour ces figures : C : conoïde, CF : couche sous-fibrillaire, M : micropyle, ME : membrane unitaire à double feuillet, MT : mitochondrie, N : noyau, Nu : nucléole, T : toxosome, TR : tubule radiale ou sous-pelliculaire.

encore visibles sur le toxoplasme de la fig. 42, Pl. VIII, certaines parties du corps du parasite paraissent vides (Pl. VIII, fig. 42, 43 et 44), par contre la structure de la paroi [membrane unitaire (ME)] et couche fibrillaire (CF) résiste assez bien (Pl. VIII, fig. 43, 44 et 45), et même la structure trilamellaire de la membrane unitaire avec la couche fibrillaire sous-jacente peut être particulièrement nette (Pl. VIII, fig. 45), net aussi le conoïde (C) de forme troncoïde avec alternance de zones claires et sombres enroulées en spirale oblique à 45° environ et les deux anneaux imbriqués de la partie apicale (Pl. VIII, fig. 43 et 45). Sans liquide nutritif les lésions sont peut-être moins profondes, mais le cytoplasme est souvent légèrement décollé de la membrane en restant entouré par les tubules sous-pelliculaires (TR) coupées transversalement (Pl. IX, fig. 47), quelquefois un décollement plus important existe au niveau de la partie apicale (Pl. IX, fig. 46), lorsque le noyau (N) est visible, il apparaît lésé (Pl. IX, fig. 46), et même en partie vide (Pl. IX, fig. 48). Les tubules sous-pelliculaires (TR) coupées longitudinalement peuvent être visibles (Pl. IX, fig. 48).

Cinq p. 100 de DMSO et le liquide nutritif permettent de trouver des formes à structures très nettes (Pl. X, fig. 49), avec noyau (N), nucléole (Nu), mitochondries (MT), mais beaucoup de formes sont largement vacuolisées (Pl. X, fig. 50) ou partiellement vers la partie apicale (Pl. X, fig. 49, toxoplasme central), ce qui permet encore une fois de voir particulièrement bien le conoïde et deux anneaux. Congelés avec 5 p. 100 de DMSO (sans liquide nutritif) (4), les structures sont reconnaissables, mais l'apparence générale est encore loin de la normale.

Avec 10 p. 100 de DMSO, nous retrouvons de beaux aspects avec les structures aisément reconnaissables : noyau-nucléole (N et Nu) avec ergastoplasme (R) particulièrement nets (Pl. XII, fig. 52), mitochondries (MT) (Pl. XIII, fig. 54), conoïdes (C) (Pl. XII, fig. 52), membrane unitaire (ME) et couche fibrillaire (CF) (Pl. XIII, fig. 55, et Pl. XIV, fig. 56), tubules sous-pelliculaires coupées transversalement (fig. 56, pl. XIV), pédicules de toxonèmes coupés transversalement (Pl. XII, fig. 52), et peut-être microphyle (M) (Pl. XIII, fig. 54). Avec le liquide nutritif, nous avons trouvé quelques formes vacuolisées, mais à un stade de vacuolisation moins poussé qu'avec 5 p. 100 de DMSO (Pl. XII, fig. 53).

Sans liquide nutritif, nous avons pu retrouver quelques phénomènes intéressants : le rassemblement des mitochondries (MT) de l'hôte autour de la vacuole contenant le parasite (Pl. XIII, fig. 55), endogénie où le noyau (N) de la cellule-mère semble imbriqué dans les deux cellules-filles (Pl. XV, fig. 57), endogénie encore, où dans les cellules-filles, les tubules sous-fibrillaires (TR) coupées transversalement sont disposées concentriquement à l'intérieur des tubules de la cellule-mère (Pl. XIV, fig. 56).

Commentaires

Les constatations obtenues grâce à l'étude morphologique confirment sensiblement les résultats fournis par les contrôles sur animal, mais avec moins de nuances et de sensibilité.

Alors que nous pensions que les colorations et particulièrement les colorations spécifiques (Feulgen par exemple) nous donneraient des résultats intéressants, c'est le May-Grünwald-Giemsa qui nous a donné les meilleures images, sans pour cela fournir un critère simple de la valeur de la congélation. Quant au pouvoir toxique du DMSO

(4) L'étude de cette série a été difficile car les cellules avaient été très lysées et les coupes comportaient peu de matériel et dans ce matériel peu de toxoplasmes.

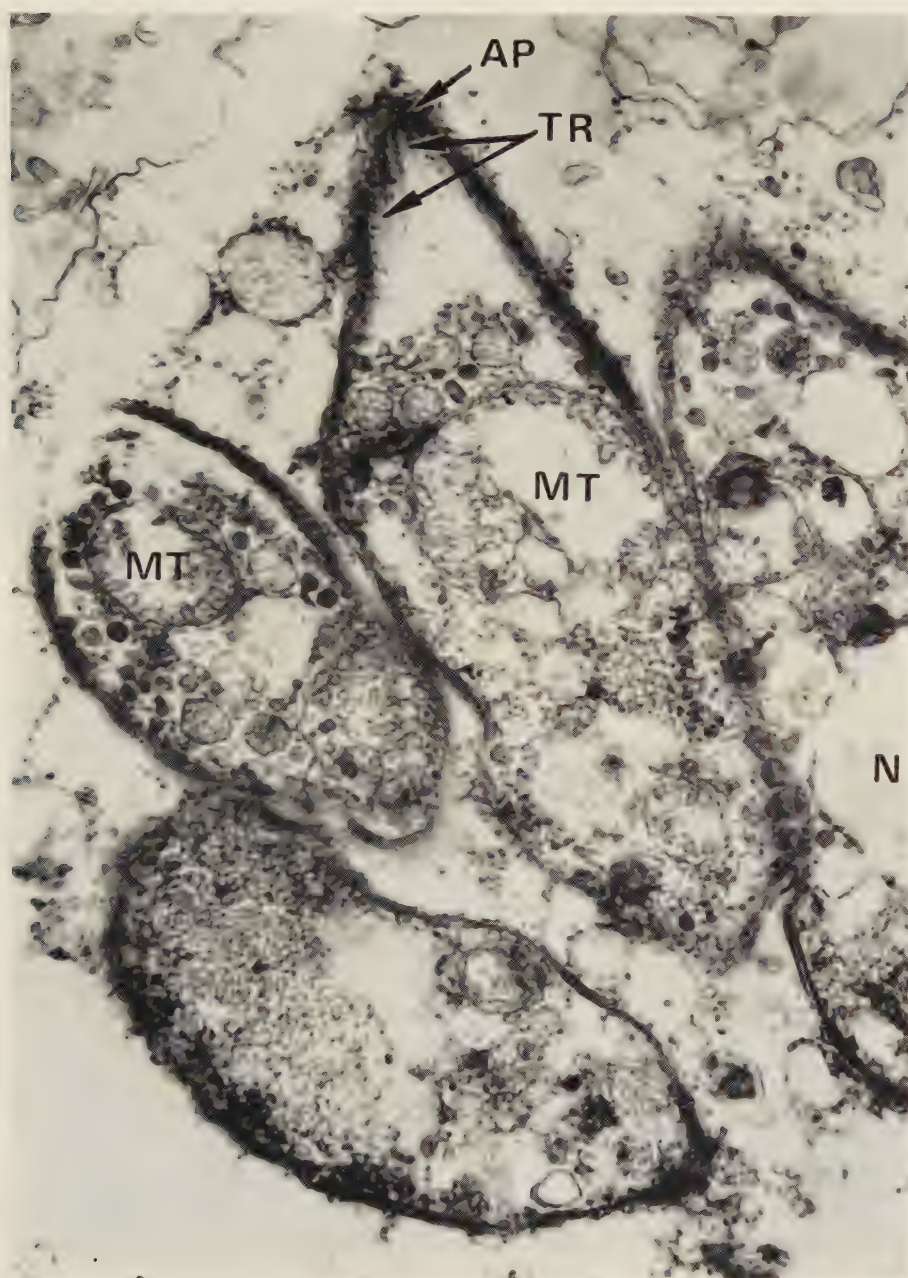


PLANCHE VII

FIG. 41. — Témoin sans congélation (Acétate d'uranyle-Citrate ds Pb) $\times 33\,250$

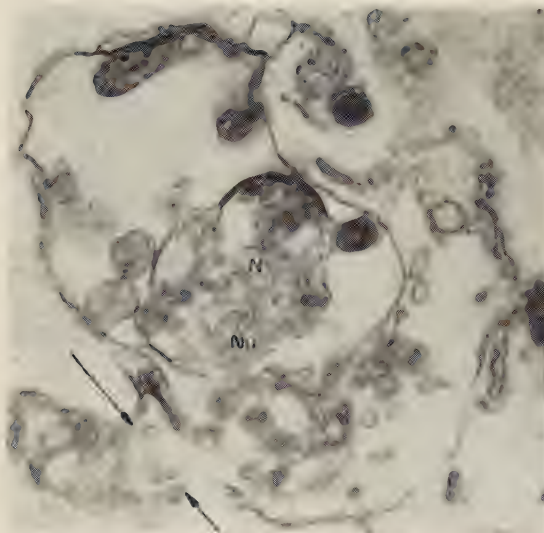
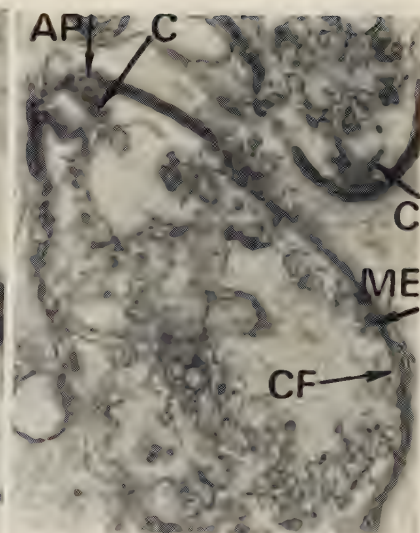
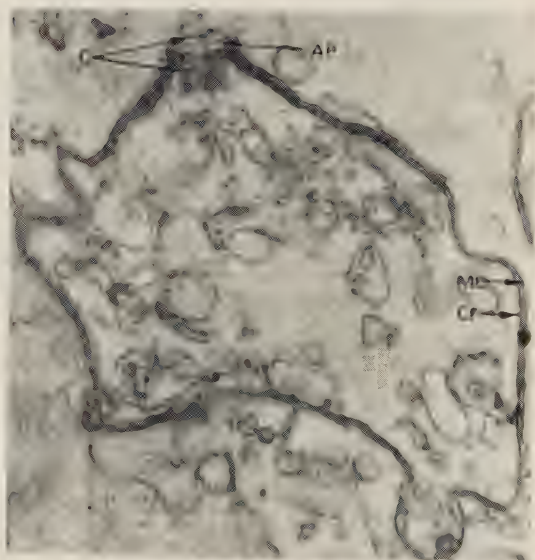
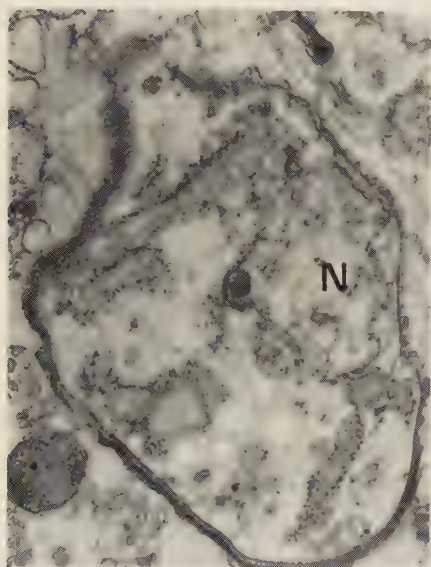
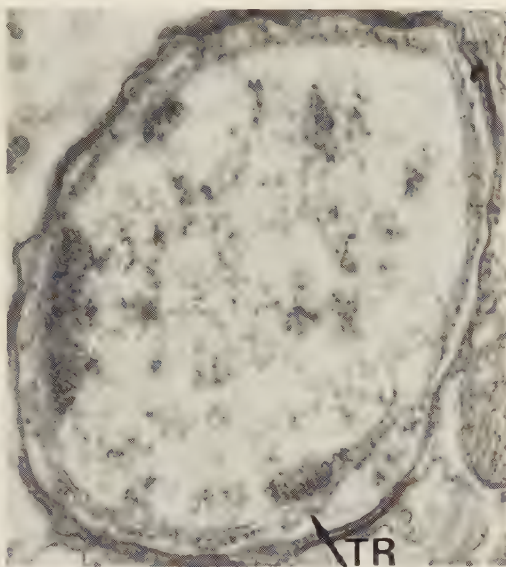
(Acétate d'uranyle-Couche de Pb) $\times 17\,725$ (Acétate d'uranyle) $\times 25\,250$ (Acétate d'uranyle) $\times 6\,310$ (Acétate d'uranyle) $\times 11\,700$

PLANCHE VIII

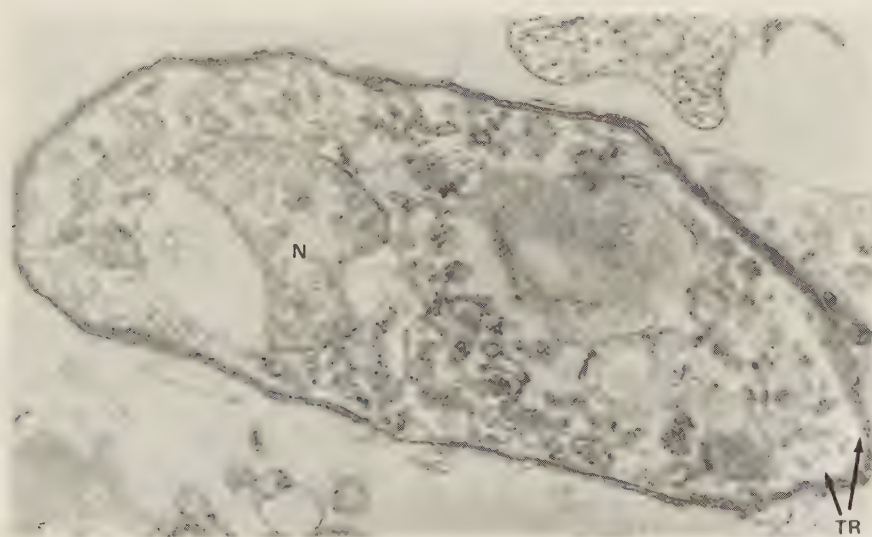
FIG. 42 à 45. — Sans DMSO, + liquide nutritif



(Acétate d'uranyle-Citrate de Pb) $\times 25\,250$



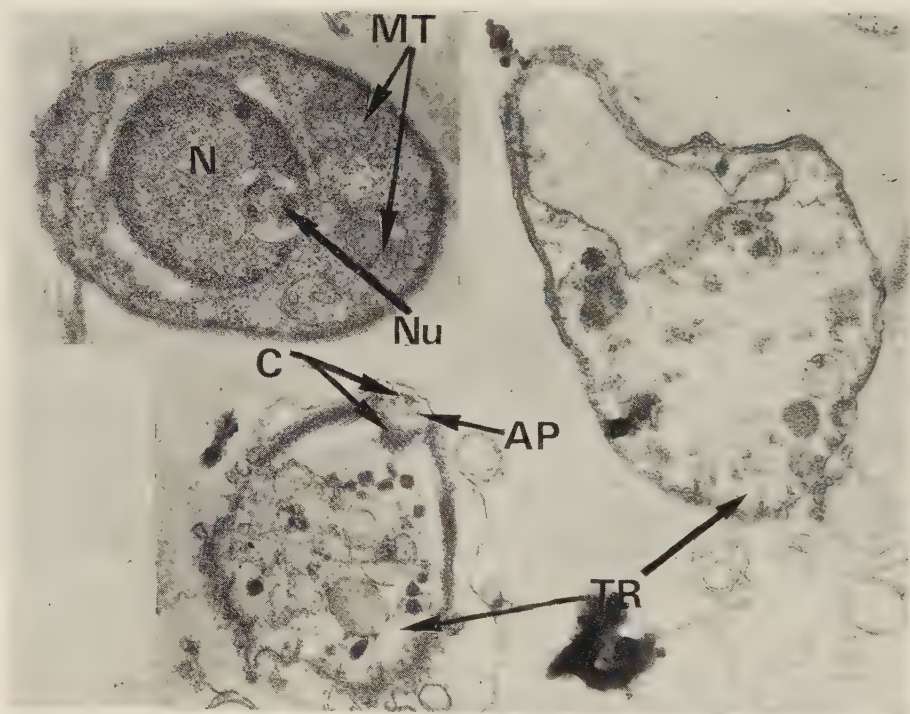
(Acétate d'uranyle-Citrate de Pb) $\times 37\,800$



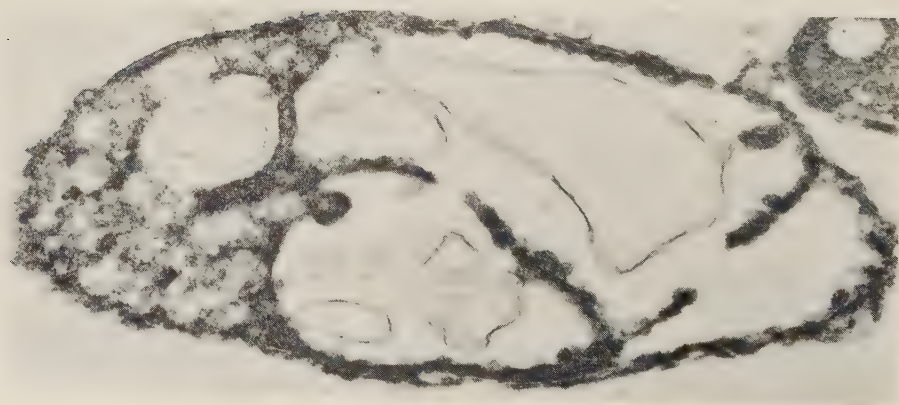
(Acétate d'uranyle) $\times 12\,340$

PLANCHE IX

FIG. 46 à 48. — Sans DMSO, sans liquide nutritif



(Acétate d'uranyle-Citrate de Pb) $\times 25\,250$



(Acétate d'uranyle) $\times 23\,400$

PLANCHE X

FIG. 49 et 50. — DMSO 5 % + liquide nutritif



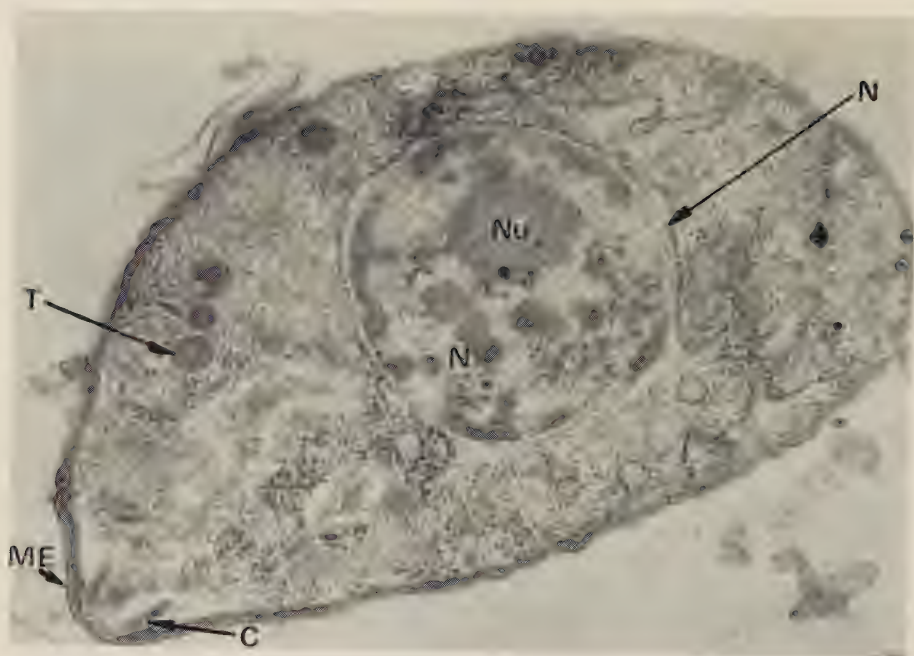
(Acétate d'uranyle-Citrate de Pb) $\times 21\,820$

PLANCHE XI

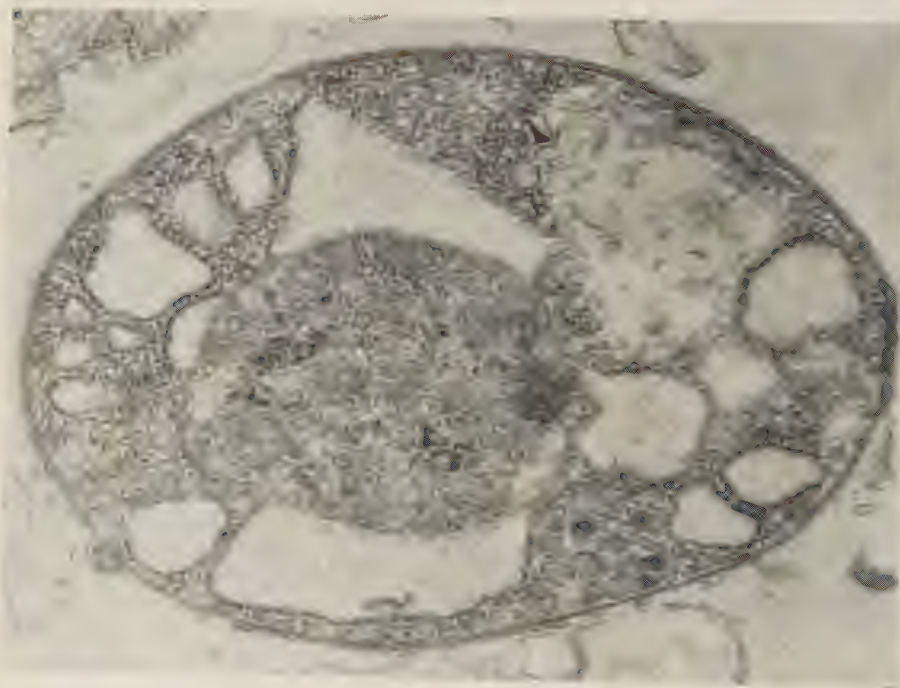
FIG. 51. — DMSO, 5 %, sans liquide nutritif

sur les toxoplasmes, décelé sur souris, il n'entraîne aucune modification morphologique apparente (pour cela nous avons coloré des toxoplasmes non congelés après 1 h 30 mn de contact avec le DMSO) (Pl. XVI, fig. 58 à 60).

Le contraste de phase a permis de juger rapidement la valeur d'une conservation ; le résultat s'évalue par le pourcentage des parasites lysés et des parasites en bon état ; mais les comparaisons sont difficiles eu égard à la masse importante des parasites



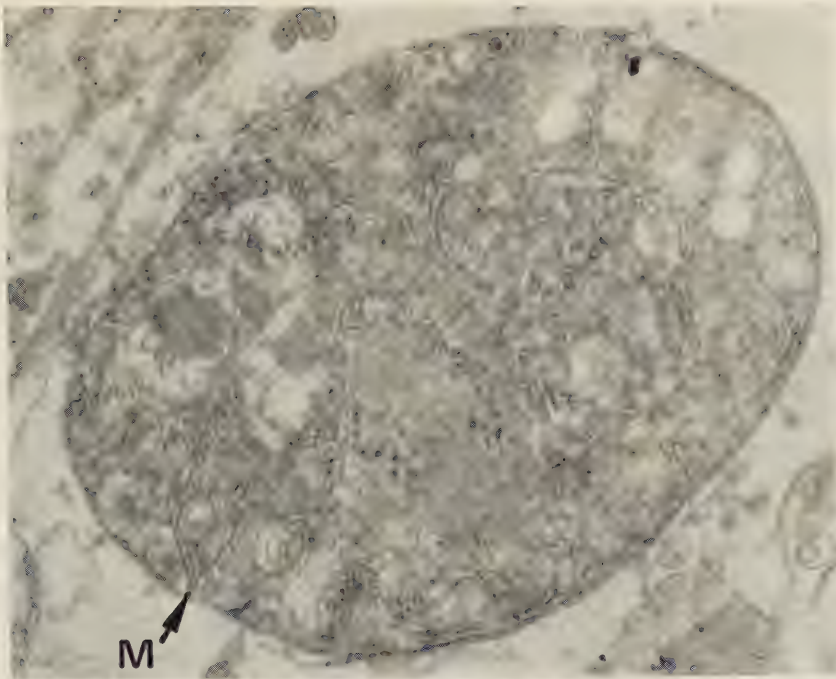
(Acétate d'uranyle-Citrate de Pb) $\times 35\,115$



(Acétate d'uranyle-Citrate de Pb) $\times 24\,120$

PLANCHE XII

FIG. 52 et 53. — DMSO, 10 % + liquide nutritif



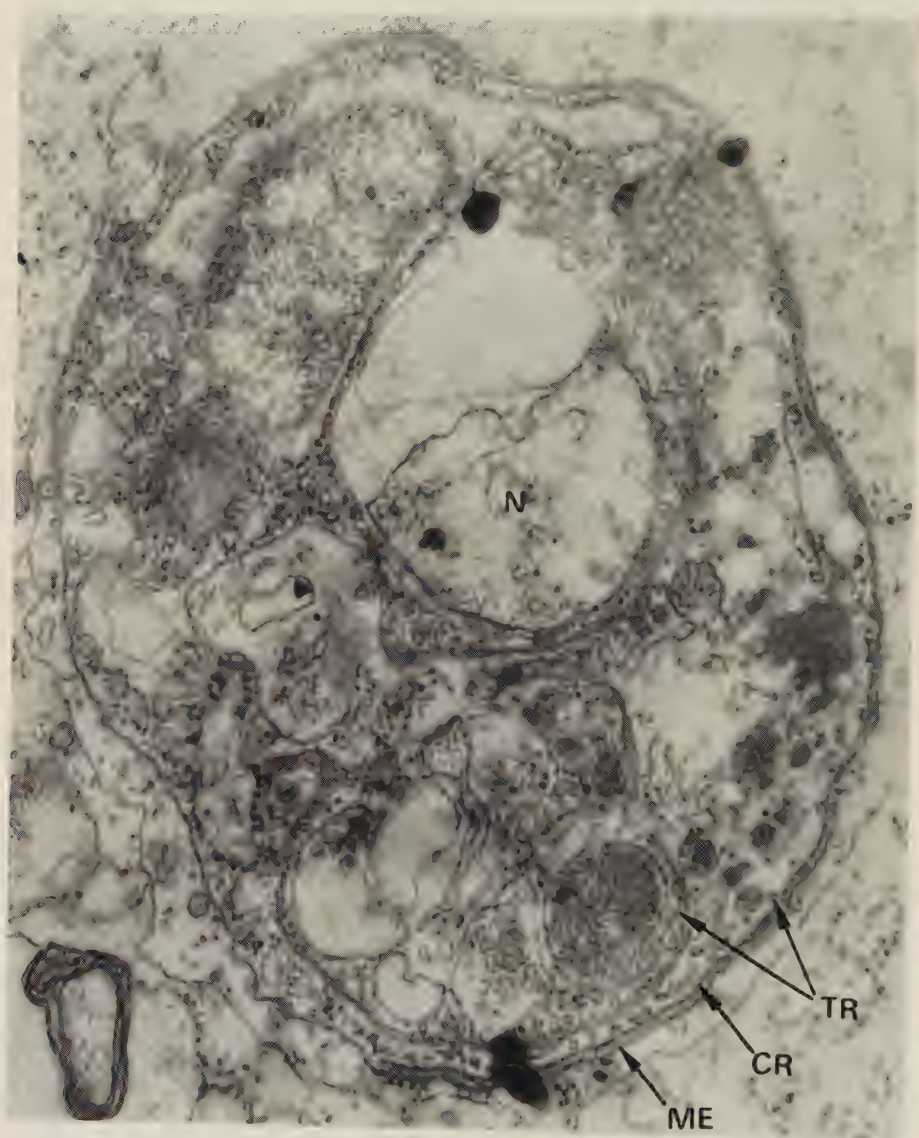
(Acétate d'uranylo-Citrate de Pb) $\times 25\ 250$



Acétate d'uranylo-Citrate de Pb) $\times 16\ 565$

PLANCHE XIII

FIG. 54 et 55. — DMSO, 10 %, sans liquide nutritif

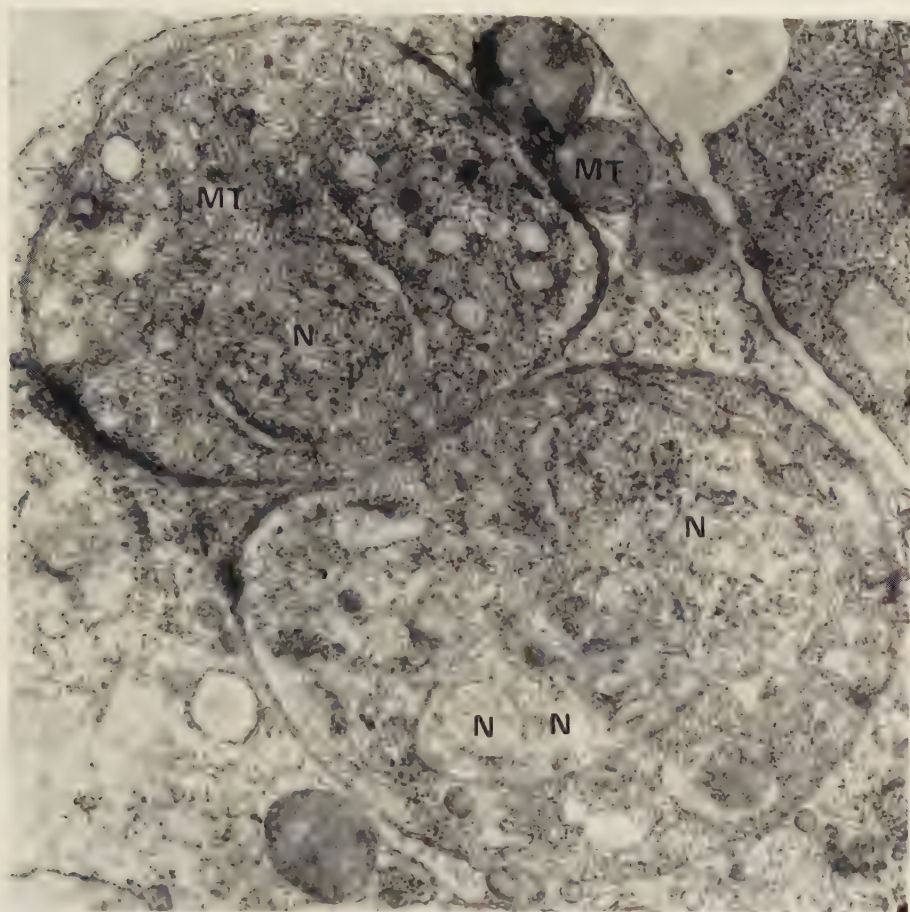


(Acétate d'uranyle-Citrate de Pb) $\times 33\,865$

PLANCHE XIV

FIG. 56. — DMSO, 10 %, sans liquide nutritif

« abîmés » parmi lesquels on trouve le passage continu de la forme normale à la forme lysée. La forme lysée après congélation est semblable à celle obtenue en test de lyse avec un sérum positif contenant des anticorps contre les toxoplasmes [Pl. XVII, fig. 61



(Acétate d'uranyle) $\times 15\,100$

PLANCHE XV

FIG. 57. — DMSO, 10 %, sans liquide nutritif

et 62): ce rapprochement morphologique traduit-il un phénomène identique (de modification de la perméabilité membranaire par exemple) provoqué par deux causes très différentes, ou l'observation assez grossière donne-t-elle une apparence d'identité ? (cf. fig. 4 à 10).

La microscopie électronique nous a permis de suivre au niveau des structures de la cellule l'influence des divers modes de conservation. Les parties rigides de la cellule (membranes, couches fibrillaires, tubules sous-pelliculaires, conoïdes, anneaux de la partie apicale) sont peu lésées, au plus, la membrane est-elle déchirée localement par les cristaux de glace qui se forment lors de conservation défectueuse. Par ailleurs, la congélation sans substance protectrice permet d'ailleurs de bien dégager des structures.

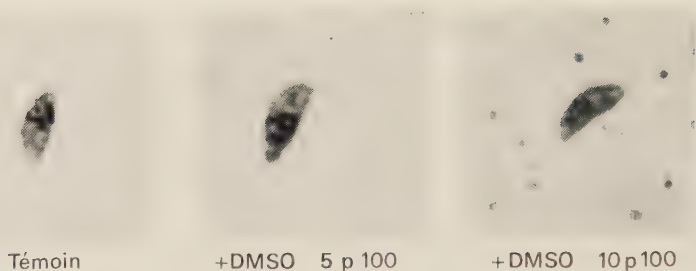


PLANCHE XVI

FIG. 58 à 60. — Action du DMSO sur un exsudat péritonéal non congelé (May-Grünwald Giemsa) $\times 1575$



PLANCHE XVII

FIG. 61 et 62. — Test de lyse (Contraste de phase $\times 1575$)

et leur étude (accompagnée de contrôle sur des témoins) serait peut-être à poursuivre, les images obtenues étant particulièrement nettes. Ceci est en apparente contradiction avec les observations au May-Grünwald-Giemsa où le contour du parasite est peu net : en fait cette coloration ne teinte pas la membrane mais le cytoplasme qui apparaît aussi gravement lésé en microscopie électronique. En l'absence de DMSO, les vacuoles observées en contraste de phase se retrouvent sur les clichés de microscopie électronique, mais les lésions du noyau n'étaient visibles qu'avec le May-Grünwald-Giemsa. Morphologiquement les toxoplasmes sur cultures cellulaires sont beaucoup mieux protégés par 10 p. 100 de DMSO et il ne semble pas que la toxicité du produit décelée sur souris entraîne des lésions cytologiques apparentes.

L'étude cytologique avec de l'exsudat péritonéal observé en contraste de phase ou coloré au May-Grünwald-Giemsa, a permis de confirmer qu'il faut faire agir le DMSO sur un exsudat dilué au 1/10 ; avec les toxoplasmes, cultivés sur cellules d'embryon de poulet, colorés au May-Grünwald-Giemsa ou observés en microscopie électronique : la meilleure conservation du point de vue cytologique est obtenue avec 10 p. 100 de DMSO.

Conservation aux basses températures de *Toxoplasma gondii*

Nicolle et Manceaux, 1909

Action du diméthyl-sulfoxyde

par N. DUMAS

*Institut Pasteur, Laboratoire des Rickettsioses
28, rue du Docteur-Roux, B.P. 520, F 75724 Paris Cedex 15*

III. — ETUDE SEROLOGIQUE DU PARASITE APRES CONGELATION

Résumé.

La congélation et la conservation à -79°C de souches de toxoplasmes, n'entraînent pas de perturbations dans les résultats des réactions sérologiques les plus couramment pratiquées pour le séro-diagnostic de la toxoplasmose (fixation du complément, test de lyse, immunofluorescence indirecte). Pour des raisons essentiellement pratiques, il est préférable, après congélation, de faire un premier passage sur souris, pour enrichir l'exsudat, celui-ci servant d'inoculum à un second passage qui produira un matériel adéquat pour la production des différents antigènes.

Summary.

Preservation of T. gondii Nicolle and Manceaux, 1909 at low temperatures. Effect of dimethyl sulfoxide. III. Serological study after freezing of the parasite.

Freezing and preservation at -79°C of *Toxoplasma* strains do not cause any variation in the results of serological reactions currently used for the sero-diagnosis of Toxoplasmosis (complement fixation, lysis-test, indirect immunofluorescence). For essentially practical reasons it is preferable after freezing to make a first injection into mice to enrich the exudate, providing an inoculum for a second injection which will produce a suitable material for the production of the various antigens.

Certains auteurs dont Deschiens et Molinari, 1963 ont mis en garde les utilisateurs des techniques de conservation aux basses températures, en présence de substances protectrices, contre d'éventuelles altérations des réponses biologiques des parasites.

Cette étude aura pour propos d'essayer de déceler les perturbations possibles lors des réactions sérologiques les plus couramment utilisées en laboratoire pour le diagnostic de la toxoplasmose, à savoir :

- la fixation du complément,
- le test de lyse,
- l'immunofluorescence.

La souche B₁₂, ayant toujours été conservée sans aucune interruption, sur souris depuis son isolement, fournit un point de comparaison absolu avec des exsudats de cette même souche, congelés. Les souches C₃₆ et D₃₆ furent entretenues plusieurs mois sur souris avant d'être comparés avec des exsudats congelés de ces souches. Pour ces deux souches non isolées par nous, nous ne connaissons pas leur passé en ce qui concerne les conservations par congélation.

Techniques

Fixation du complément *

Dès 1937 Nicolau et Ravelo démontrent la présence d'anticorps fixant le complément chez des animaux infectés par des toxoplasmes. Depuis, cette technique, bien qu'assez peu sensible, mais applicable dans n'importe quel laboratoire de diagnostic, a été largement utilisée.

Actuellement les antigènes sont généralement préparés, soit à partir du milieu nutritif de cultures cellulaires infectées, soit à partir d'exsudats péritonéaux de souris toxoplasmiques. C'est à ce dernier matériel que nous nous sommes adressés pour deux raisons : d'une part, la souris, très sensible à *Toxoplasma gondii*, permet une meilleure culture des parasites après congélation, d'autre part, les exsudats fournissent des antigènes de pouvoir antigénique plus élevé.

Nous avons comparé les antigènes par la méthode de titrage ci-après.

Les sérums positifs ont été dilués de 1/2 en 1/2, du 1/4 au 1/512. Ils avaient été inactivés à 56 °C à la dilution du 1/4, ainsi que les sérums négatifs, utilisés à cette seule dilution.

Les antigènes à titrer ont été dilués au 1/10, 1/20, 1/40, 1/60, 1/80 pour une première série de titrage et au 1/2, 1/4, 1/8, 1/10, 1/20 pour une seconde série.

(*) Nous remercions M^{me} Virat, Chef du Laboratoire de Sérologie, service des Virus, Institut Pasteur - Paris, de nous avoir communiqué sa technique de fixation du complément ainsi que les sérums de référence.

Les dilutions de sérums ont été réparties dans les rangées verticales à raison d'une goutte par cupule, celles d'antigènes dans les rangées horizontales aussi à raison d'une goutte par cupule d'une plaque de plexiglas selon le schéma suivant.

		Dilutions du sérum +							
		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
Dilutions de l'anti- gène	1/2 ou → 1/10								
	1/4 ou → 1/20								
	1/8 ou → 1/40								
	1/10 ou → 1/60								
	1/20 ou → 1/80								

En outre on compare le dosage avec un antigène de référence de titre connu mis en présence des dilutions du sérum positif, on met aussi en présence des dilutions de ce sérum et une suspension-témoin de l'antigène, et dans une autre série, le diluant. Nous avons mis en présence les dilutions des antigènes et le sérum négatif au 1/4. Un témoin sérum négatif en présence de diluant est distribué.

Ensuite chaque cupule reçoit 2 gouttes de complément préalablement dosé renfermant 2 Unités-Hémolyse 100, trois cupules témoins-complément reçoivent respectivement 2 U, 1 U, 1/2 U de complément. Enfin une cupule contenant seulement du diluant sera le témoin des hématies sensibilisées.

Les plaques après une nuit à + 4 °C sont mises 30 mn à l'étuve à 37 °C, avant que soit ajouté le système hémolytique constitué à parties égales de sérum hémolytique à 3 unités et de globules rouges de mouton à 2 p. 100. Les plaques sont remises à l'étuve à 37 °C, 15 mn puis, après vérification de la lyse des témoins, placées à + 4 °C pour laisser sédimenter, ce qui facilite la lecture.

L'unité antigénique est définie comme la plus grande dilution d'antigène qui donne une fixation en présence de la plus grande dilution de sérum.

Test de lyse

Cette réaction est une modification apportée par Lelong et Desmonts (1951 et 1952) au test de Sabin et Feldman (1948) ou dye-test.

Le dye-test permet de déceler la présence d'anticorps toxoplasmiques, ceux-ci empêchant la coloration vitale des toxoplasmes par le bleu de méthylène, la réaction nécessitant la présence du « Facteur accessoire », identique à l'ensemble « complément + propardine ».

Cette non-coloration des toxoplasmes correspond à une perte de vitalité des parasites qui sont partiellement lysés par les anticorps : cette lyse est aisément visible au microscope à contraste de phase. C'est la lecture de la réaction au contraste de phase, évitant la coloration délicate au bleu de méthylène, qui fut préconisée par Lelong et Desmonts, 1951.

Pour comparer nos antigènes d'une façon plus sensible nous nous sommes adressés à la réaction quantitative du test de lyse, afin de comparer les éventuelles variations du taux limite de positivité d'un sérum anti-toxoplasmique connu.

Test d'immunofluorescence indirecte (Ambroise-Thomas, 1969)

Cette technique a été préférée à l'immunofluorescence directe dont les résultats semblent toujours s'être montrés très inférieurs.

La réaction se fait en deux temps : le premier consistant à fixer les anticorps spécifiques éventuellement présents dans un sérum, sur les parasites, le second révélant cette fixation par un conjugué fluorescent contenant des anti-globulines correspondant au sérum testé dans le premier temps.

Résultats

Fixation du complément

La comparaison la plus valable est faite avec la souche B₁₂ qui depuis son isolement n'a jamais été congelée, mais conservée par passages péritoine-péritoine sur souris.

Pour la simplicité de l'exposé, les résultats obtenus avec la souche B₁₂ d'une part, et les souches C₃₆-D₃₆ d'autre part, seront exposés indépendamment.

Souche B₁₂

Une première comparaison a été faite entre un antigène fabriqué à partir d'exsudats prélevés à 48 heures sur la souche n'ayant jamais subi de congélation et un antigène fabriqué à partir d'exsudats prélevés sur des souris inoculées avec une suspension congelée diluée au 1/10 avec 10 p. 100 de DMSO et conservée 15 jours à — 79 °C. Les souris inoculées avec l'exsudat congelé ne fournissent un exsudat suffisamment abondant pour fabriquer l'antigène que 7 jours après l'inoculation.

Le sérum positif était un sérum de lapin expérimental, le sérum négatif : un sérum de lapin neuf, sans anticorps vis-à-vis des toxoplasmes.

Les résultats suivants furent obtenus :

Sérum +		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	Sér. — au 1/4	Di- lant
B 12 sans congélation	1/10	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
	1/20	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
	1/40	+	+	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/60	+	±	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	+	±	+	0	0	0	0	0	0	0
				=							
B 12 15 jours à — 79 °C	1/10	+	+	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/20	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/40	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/60	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
				=							
Témoins antigène	2 U	+	+	+	+	+	+	+	0	0	
	1 U	+	0	0	0	0	0	0	0	0	
				=							
Témoins diluant		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Complément		0	0	0	0						
		2 U	1 U	1/2 U	H *	* Témoin hématies sensibilisées					

On voit que l'antigène obtenu après congélation a un pouvoir antigénique nettement inférieur à celui obtenu sans congélation. Mais des critiques sont à adresser à cet antigène : en effet, le pouvoir infectant de l'inoculum congelé est très inférieur à celui de l'inoculum non congelé (cf. 1^{re} partie) entraînant un allongement de la production d'exsudat en quantité suffisante pour être prélevée.

Or, s'il est conseillé de prélever les exsudats précocement pour les antigènes, c'est qu'après 3 jours, l'animal commence à produire des anticorps contre les toxoplasmes, amoindrissant la valeur antigénique du matériel : notre antigène n'a pu être prélevé que 7 jours après l'inoculation.

Aussi avons-nous comparé l'antigène sans congélation, avec des antigènes de 1^{er} passage après congélation, de 2^e passage et de 3^e passage, puisque nous avons constaté (cf. 1^{re} partie) que c'est après 2 ou 3 passages que la suspension de toxoplasmes congelés retrouvait son pouvoir pathogène initial.

Lors de la première série de titrages, le sérum positif de lapin n'agissait jusqu'au 1/256 avec l'antigène de référence, le sérum négatif était aussi un sérum de lapin.

Les antigènes à titrer furent dilués au 1/10, 1/20, 1/40, 1/60, 1/80.

Les résultats obtenus furent les suivants :

Sérum +		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	Sér. — au 1/4	Di- luant
B 12 sans congé- lation	1/10	+	+	+	±	0	0	0	0	0	0
	1/20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B 12, 1 ^{er} passa- ge après 1 mois à — 79° C	1/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B 12, 2 ^e passage après 1 mois à — 79° C	1/10	+	+	+	±	±	0	0	0	0	0
	1/20	+	+	+	±	±	0	0	0	0	0
	1/40	+	+	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/60	±	±	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	±	±	±	0	0	0	0	0	0	0
B 12, 3 ^e passage après 1 mois à — 79° C	1/10	±	±	±	±	±	±	±	0	0	0
	1/20	±	±	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Témoins antigène	2 U	+	+	+	+	±	±	±	0	0	
	1 U	±	±	±	±	0	0	0	0	0	
Témoins diluant		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Complément		0	0	0	0						

2 U 1 U 1/2 U H *

* Témoin hématies sensibilisées

Les antigènes obtenus aux deuxième et troisième passages après congélation sont plus antigéniques que ceux obtenus avant congélation. L'absence du pouvoir antigénique de l'antigène de premier passage après congélation s'explique par le fait qu'il fallut attendre une semaine pour pouvoir prélever sur les souris de petites quantités d'exsudat assez pauvres en parasites mais contenant déjà des anticorps toxoplasmiques.

Une autre série d'antigènes fut titrée de la même façon, mais en diluant les antigènes au 1/2, 1/4, 1/8, 1/10, 1/20, afin d'augmenter la précision des résultats. Le sérum de lapin était positif à 1/512.

Le tableau suivant consigne les résultats.

Sérum +		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	Sér. — au 1/4 luant	Di- lant
B 12 sans congé- lation	1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
	1/4	+	+	+	+	+	+	+	+	±	0
	1/8	+	+	+	+	+	±	0	0	0	0
	1/10	+	+	+	±	0	0	0	0	0	0
	1/20	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0
B 12, 1 ^{er} passa- ge après 1 mois à — 79° C	1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
	1/4	+	+	+	+	+	+	+	±	0	0
	1/8	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
	1/10	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
	1/20	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
B 12, 2 ^e passage après 1 mois à — 79° C	1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
	1/4	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	1/8	+	+	+	±	0	0	0	0	0	0
	1/10	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
	1/20	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B 12, 3 ^e passage après 1 mois à — 79° C	1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
	1/4	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	1/8	+	+	+	+	+	±	0	0	0	0
	1/10	+	+	+	±	0	0	0	0	0	0
	1/20	+	+	±	0	0	0	0	0	0	0
Témoins antigè- ne	2 U	+	+	+	+	+	+	+	+	0	
	1 U	±	0	0	0	0	0	0	0	0	
Témoins diluant		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Complément		0	0	0	0						
2 U 1 U 1/2 U H * * Témoin hématies sensibilisées											

L'unité antigénique étant définie comme la plus grande dilution d'antigène qui donne une fixation en présence de la plus grande dilution de sérum, cette série donnerait les titrages suivants :

— sans congélation	1/4
— 1 ^{er} passage après congélation	1/4
— 2 ^e passage après congélation	1/4
— 3 ^e passage après congélation	1/4

Si on regarde les pouvoirs antigéniques des suspensions aux différentes dilutions, on constate un décalage au 1/8 et au 1/10 pour les suspensions de 1^{er} et 2^e passages après congélation, alors que le titrage de l'antigène obtenu avec le troisième passage est pratiquement identique au titrage de l'antigène obtenu avec la souche B₁₂ n'ayant jamais subi de congélation.

(suite de la 2^e série de titrages).

	1/10	+	+	+	+	±	±	0	0	0	0
C 36, 1 ^{er} passage	1/20	+	+	+	±	±	0	0	0	0	0
après 1 mois	1/40	+	+	+	±	0	0	0	0	0	0
à — 79° C	1/60	±	±	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	±	±	0	0	0	0	0	0	0	0
C 36, 2 ^e passage	1/10	+	±	±	±	0	0	0	0	0	0
après 1 mois à	1/20	±	±	±	0	0	0	0	0	0	0
— 79° C	1/40	±	±	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/60	±	±	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C 36, 3 ^e passage	1/10	+	+	+	+	±	±	0	0	0	0
après 1 mois à	1/20	+	+	±	±	±	±	0	0	0	0
— 79° C	1/40	+	+	±	±	0	0	0	0	0	0
	1/60	+	±	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	±	±	0	0	0	0	0	0	0	0
Témoins antigène	2 U	+	+	+	+	±	±	±	0	0	
	1 U	±	±	±	±	0	0	0	0	0	
Témoins diluant		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Complément		0	0	0	0						

2 U 1 U 1/2 U H *

* Témoin hématies sensibilisées

Les première et seconde séries de titrages montrent une baisse de pouvoir antigénique aux premiers passages après congélation, ainsi qu'au second passage dans la seconde série. Pour cette seconde série, le titre du troisième passage (1/10) est le même que celui de la suspension « sans congélation ». La troisième série de titrages ne montre pas de variations antigéniques notables pour l'antigène « sans congélation », celui du premier passage et celui du second passage (titre au 1/4), alors que l'antigène de troisième passage atteint un titre plus élevé (1/8).

3^e série de titrages.

Sérum +	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	Sér. — au 1/4	Di- lant
C 36 sans congé- lation	1/2	+	+	+	+	+	+	+	±	+
	1/4	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	1/8	+	+	+	+	±	0	0	0	0
	1/10	+	+	±	0	0	0	0	0	0
	1/20	+	±	0	0	0	0	0	0	0

3^e série de titrages.

Sérum +		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	Sér. — au 1/4	Di- luant
D 36 sans congé- lation	1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	1/4	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	1/8	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
	1/10	+	+	+	+	±	0	0	0	0	0
	1/20	+	+	+	±	0	0	0	0	0	0
D 36 1 ^{er} passage après 1 mois à — 79 °C	1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	1/4	+	+	+	+	±	±	0	0	0	0
	1/8	+	+	+	±	0	0	0	0	0	0
	1/10	+	+	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/20	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
D 36 2 ^e passage après 1 mois à — 79 °C	1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	1/4	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	1/8	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
	1/10	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
	1/20	+	+	±	0	0	0	0	0	0	0
D 36 3 ^e passage après 1 mois à — 79 °C	1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±
	1/4	+	+	+	+	+	+	±	0	0	0
	1/8	+	+	+	+	±	0	0	0	0	0
	1/10	+	+	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/20	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
Témoins antigè- ne	2 U	+	+	+	+	+	+	+	+	0	
	1 U	±	0	0	0	0	0	0	0	0	
Témoins diluant		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Complément		0	0	0	0						

2 U 1 U 1/2 U H *

* Témoin hématies sensibilisées

Les suspensions D₃₆ faites avec l'exsudat de premier passage montrent comme pour les autres souches une baisse d'antigénicité, mais la valeur antigénique se retrouve toujours aux second et troisième passages.

Test de lyse

Pour nos trois souches, il n'a pas pu être fait de comparaison entre souche non congelée et premier passage après congélation d'un mois à — 79 °C avec 10 p. 100 de DMSO et une dilution de l'exsudat au 1/10, ce premier passage ne permettant pas un prélèvement d'ascite 48 heures après inoculation.

Les second et troisième passages après congélation ont été pour chaque souche, comparés respectivement avec de l'exsudat témoin provenant de souris inoculées avec de l'exsudat non congelé. Chaque exsudat a été éprouvé vis-à-vis d'un sérum humain positif et d'un sérum humain négatif, ainsi que d'un sérum de lapin positif et d'un

sérum de lapin négatif. Les sérums positifs étaient conservés depuis cinq ans : le sérum humain était + au 1/10, $\pm$ au 1/100, O au 1/1000, le sérum de lapin était + au 1/1000, $\pm$ au 1/10000, O au 1/100000, c'est pourquoi nous avons fait des dilutions plus élevées pour le sérum de lapin expérimental.

Souche B₁₂

Les résultats suivants furent obtenus :

Sérums humains

Sérum +	SM	1/10	1/100	1/1 000	Sérum —
B 12 2 ^e passage après congélation	+	+	22 p. 100	0	0
B 12 Témoin sans congélation	+	+	14 p. 100	0	0
B 12 3 ^e passage après congélation	+	+	25 p. 100	0	0
B 12 Témoin sans congélation	+	+	30 p. 100	0	0

Sérums de lapin

Sérum +	1/10	1/100	1/1 000	1/10 000	Sérum —
B 12 2 ^e passage après congélation	+	25 p. 100	8 p. 100	0	0
B 12 Témoin sans congélation	+	30 p. 100	12 p. 100	0	0
B 12 3 ^e passage après congélation	+	40 p. 100	0	0	0
B 12 Témoin sans congélation	+	33 p. 100	11 p. 100	0	0

Les résultats sont assez homogènes, car si on constate quelques écarts dans les pourcentages de toxoplasmes lysés, ces écarts n'entraîneraient pas de différences dans les réponses relatives aux positivités des sérums.

*Souche C₃₆**Sérums humains*

Sérum +	SM	1/10	1/100	1/1 000	Sérum —
C 36 2° passage après congélation	+	+	0	0	0
C 36 Témoin sans congélation	+	+	33 p. 100	0	0
C 36 3° passage après congélation	+	+	34 p. 100	0	0
C 36 Témoin sans congélation	+	+	32 p. 100	0	0

Sérums de lapin

Sérum	1/10	1/100	1/1 000	1/10 000	Sérum —
C 36 2° passage après congélation	+	19 p. 100	0	0	0
C 36 Témoin sans congélation	+	32 p. 100	21 p. 100	0	0
C 36 3° passage après congélation	+	30 p. 100	18 p. 100	0	0
C 36 Témoin sans congélation	+	35 p. 100	15 p. 100	0	0

*Souche D₃₆**Sérums humains*

Sérum +	SM	1/10	1/100	1/1 000	Sérum —
D 36 2° passage après congélation	+	+	47 p. 100	0	0
D 36 Témoin sans congélation	+	+	21 p. 100	0	0
D 36 3° passage après congélation	+	+	30 p. 100	0	0
D 36 Témoin sans congélation	+	+	46 p. 100	0	0

Sérums de lapin

Sérum +	1/10	1/100	1/1 000	1/10 000	Sérum —
D 36 2 ^e passage après congélation	+	44 p. 100	56 p. 100	0	0
D 36 Témoin sans congélation	+	56 p. 100	66 p. 100	0	0
D 36 3 ^e passage après congélation	+	28 p. 100	23 p. 100	0	0
D 36 Témoin sans congélation	+	22 p. 100	0	0	0

Immunofluorescence indirecte :

Le sérum positif était un sérum humain de malade dont les résultats en pratique courante avaient été les suivants : + au 1/400, + au 1/1000, $\pm$ au 1/2000. Le sérum négatif était aussi un sérum humain.

Les exsudats des différentes souches ont été conservés 1 mois à -79°C avant d'être réinoculés à des souris : pour les premiers passages de chacune des trois souches, les exsudats ont été prélevés 6 jours après inoculation, alors que tous les autres exsudats ont été prélevés 48 heures après inoculation.

Souche B₁₂

Sérum +	1/400	1/1 000	1/2 000	Sérum —
B 12 sans congélation ..	+	+	$\pm$	0
B 12 1 ^{er} passage après congélation	+	$\pm$	+	0
B 12 2 ^e passage après congélation	+	+	+	0
B 12 3 ^e passage après congélation	+	+	0	0

Les résultats, quel que soit le passage, sont assez homogènes, sauf pour le troisième passage où le sérum positif aurait été répondu à un taux inférieur, pour un séro-diagnostic.

Souche C₃₆

Sérum +	1/400	1/1 000	1/2 000	Sérum —
C 36 sans congélation	+	+	+	0
C 36 1 ^{er} passage après congélation	+	+	+	0
C 36 2 ^e passage après congélation	±	+	±	0
C 36 3 ^e passage après congélation	+	+	±	0

Les résultats pour cette souche sont très homogènes et il faut noter que les lectures étaient particulièrement nettes.

Souche D₃₆

Sérum +	1/400	1/1 000	1/2 000	Sérum —
D 36 sans congélation ..	+	±	$\frac{+}{=}$	0
D 36 1 ^{er} passage après congélation	+	+	+	0
D 36 2 ^e passage après congélation	+	±	0	0
D 36 3 ^e passage après congélation	+	±	0	0

Les résultats du sérum positif avec l'antigène de 2^e et 3^e passages sont inférieurs d'un taux, mais d'une façon générale les lectures avec cette souche sont difficiles.

Commentaires

Les résultats obtenus avec trois des techniques les plus utilisées actuellement pour le sérodiagnostic de la toxoplasmose ne montrent pas de différences importantes entre les souches entretenues sur souris et les souches conservées à — 79 °C. Pratiquement, après la congélation, il faut attendre le second passage sur animaux, d'une part parce que les résultats des premiers passages ne sont pas toujours satisfaisants, d'autre part parce que la faible quantité d'exsudat produit tardivement au premier passage, aboutissent à des conditions défavorables pour la fabrication des antigènes. Ainsi que nous

l'avons proposé en première partie, le premier passage après congélation doit être considéré comme fait avec un inoculum très pauvre.

Dans la pratique courante, les antigènes de fixation du complément n'ont pas toujours la même valeur antigénique et certains insuffisamment antigéniques doivent être rejetés, ceci en dehors de toute congélation. Ainsi au tableau p. 270, nous voyons que l'antigène B₁₂, bien que la souche n'ait jamais été congelée, donne un antigène de valeur très inférieure au témoin, alors qu'au troisième passage, nous retrouvons un taux-limite équivalent au taux de l'antigène-témoin.

Le test de lyse par contre a donné des résultats relativement plus homogènes, quoique les critiques faites à cette réaction soient nombreuses, la principale étant le problème de l'étalonnage antigénique difficile avec un antigène vivant : nous utilisons toujours un exsudat de 48 heures, très riche en toxoplasmes, aussi nous devons toujours faire la réaction avec un excès d'antigène. Les résultats défavorables obtenus en fixation du complément avec les antigènes des premiers passages près congélation, ne pouvaient être vérifiés en test de lyse.

Le mode de fabrication des antigènes d'immunofluorescence indirecte doit faire éviter l'écueil de la pauvreté antigénique constatée lors des premiers passages en fixation du complément sur le dernier culot de lavage, on fait un comptage grossier et on cherche à obtenir un antigène dont la richesse soit environ de 1.500.000 toxoplasmes par ml. Mais cette dernière réaction est par là justement intéressante car elle montre qu'à richesse égale en toxoplasmes, le premier passage après congélation est aussi antigénique que les second et troisième, ou que les antigènes obtenus sans congélation.

Cette analyse antigénique obtenue par les réactions sérologiques courantes n'est que très grossière, et il faudrait étudier le devenir des différentes fractions antigéniques par les techniques immunologiques fines d'électrophorèse, cela pourrait constituer un travail important et complet en lui-même, alors que nous nous étions proposés de vérifier s'il était valable de conserver les souches de toxoplasmes à basses températures sans que cela perturbe les résultats des réactions sérologiques courantes.

CONCLUSIONS GENERALES

Toxoplasma gondii, fait l'objet de recherches dans de nombreux laboratoires et la toxoplasmose voit son importance s'accroître depuis ces dernières années, en pathologie humaine et animale. La conservation de ce parasite s'effectue traditionnellement par passages bi-hebdomadaires sur souris, méthode aléatoire, astreignante et coûteuse. C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'étudier une technique de conservation à la fois simple et efficace, qui respecte l'intégrité biologique du parasite.

De toutes les méthodes utilisées jusqu'ici pour conserver *Toxoplasma gondii*, la plus simple et la plus sûre paraît être celle décrite dans ce travail. Elle consiste à congeler lentement jusqu'à — 79 °C de l'exsudat péritonéal de souris infectées, dilué au 1/10 en eau physiologique avec adjonction de 10 p. 100 de DMSO, à le conserver à — 79 °C et à le décongeler rapidement à 37 °C. Dans de telles conditions les caractères biologiques et sérologiques du parasite ne sont pas modifiés.

Le diméthyl-sulfoxyde n'est pas dénué de toxicité pour les toxoplasmes, ce qui ne permet pas d'utiliser ce produit à des doses supérieures à 10 p. 100 ; mais à cette dose il est moins toxique que la glycérine et doué d'un meilleur pouvoir protecteur (ce dernier caractère étant particulièrement net lors de conservations prolongées).

Nous avons ainsi conservé pendant des périodes allant de plusieurs mois jusqu'à plusieurs années (5 ans 1/2), quatre souches de toxoplasmes avec une perte transitoire de pouvoir infectant, consécutive à la congélation, mais sans perte de virulence.

Ces résultats sont applicables aux toxoplasmes se multipliant sur cellules en culture.

L'étude cytologique a confirmé et précisé les résultats expérimentaux de la première partie, que ce soit en contraste de phase à l'état frais ou après fixation et coloration en microscopie optique et en microscopie électronique. Particulièrement en microscopie électronique, des lésions profondes du cytoplasme et de ses structures, du noyau et du nucléole sont constatées, alors que les éléments contribuant à donner son architecture au toxoplasme (membranes, tubules, conoïde, etc.) sont peu touchés et très visibles alors même que la vitalité de la cellule est profondément atteinte. Ceci confirme bien que l'action du froid, lors de mauvaises congélations n'est pas seulement mécanique : les membranes, très résistantes, apparaissent assez peu déchirées. Le froid exerce plutôt son action létale en modifiant les perméabilités membranaires, provoquant des modifications importantes des perméabilités ioniques, dénaturant les protéines cellulaires.

La conservation des souches de toxoplasmes dans les conditions définies ci-dessus n'entraîne pas de perturbations lors des différentes réactions sérologiques pratiquées couramment pour le sérodiagnostic de la toxoplasmose (fixation du complément, test de lyse, immunofluorescence indirecte).

Nous pouvons donc conclure que l'entretien des souches de toxoplasmes sur souris peut-être évité en congelant ces parasites en présence de diméthyl-sulfoxyde : ils peuvent ainsi être conservés plusieurs années ; une telle méthode n'entraîne pas de modifications biologiques et sérologiques.

Bibliographie

- AMBROISE-THOMAS (P.), 1969. — Etude séro-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immunofluorescence. Institut de Médecine et d'Hygiène Tropicale. Faculté de Médecine de Lyon.
- ANDJUS (R. K.), 1955. — Suspended animation in cooled, super cooled and frozen rats. *J. Physiology*, 128, 547-556.
- et RAJEVSKI (V.), 1961. — Réanimation du cœur isolé de grenouille après congélation. Effet du calcium. *J. Physiol.*, 53, 245-246.
- , — et POVLOVIC-HOURNAC (M.), 1962. — Réanimation et transplantation du cœur fœtal de Rat après congélation. *J. Physiol.*, 54, 272-273.
- ANSEL (H. C.) et LEAKE (W. F.), 1966. — Hemolysis of Erythrocytes by Antibacterial Preservatives III. Influence of Dimethyl-sulfoxyde on the Hemolytic activity of Phenol. *J. Pharm. Sc.*, 55, 685-688.

- ASHWOOD-SMITH (M. J.), 1967. — Radioprotective and Cryoprotective Properties of Dimethyl-Sulfoxide in Cellular Systems. Biological Actions of dimethyl-sulfoxide, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 141, 45-62.
- BECQUEREL (P.), 1909. — Sur la suspension momentanée de la vie chez certaines graines. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), (1) 149, 1052-1054.
- , 1910. — Recherches expérimentales sur la vie latente des spores des Mucorinées et des Ascomycètes. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), 1, 150, 1437-1439.
- , 1925. — La suspension de la vie des graines dans le vide à la température de l'hélium liquide. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), 181, 805-807.
- , 1932. — La reviviscence des plantules desséchées soumises aux actions du vide et à de très basses températures. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), 194, 2158-2159.
- , 1936. — La vie latente de quelques Algues et Animaux inférieurs aux basses températures et la conservation de la vie dans l'univers. *C.R. Acad. Sci.*, 202, 978-981.
- , 1937. — La mort par le gel de la cellule végétale dans l'azote liquide à — 190 °C. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), 204, 1267-1269.
- , 1948. — Reviviscence du *Xantheria parietina* desséché avec sa faune, six ans dans le vide et deux semaines à — 189 °C. Ses conséquences biologiques. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), 226, 1413.
- , 1950. — La suspension de la vie au-dessous de 1/20 °K absolu par démagnétisation adiabatique de l'alun de fer dans le vide le plus élevé. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), 231, 261.
- , 1950. — La vie latente des graines aux confins du zéro absolu. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), 231, 1274-1277.
- BEN RACHID (M. S.), 1970. — Contribution à l'étude de la toxoplasmose du gondi. II. Comportement de *Ctenodactylus gundi* vis-à-vis d'*Isospora bigemina*. *Arch. Inst. Pasteur, Tunis*, 47, 33-35.
- et BLAHA (R.), 1969. — Contribution à l'étude de la toxoplasmose du gondi. I. Sensibilité du *Ctenodactylus gundi* à la souche Beverley de *toxoplasma*. *Arch. Inst. Pasteur, Tunis*, 46, 217-226.
- BOURONCLE (B. A.), 1965. — Preservation of Living cells at — 79 °C with Dimethyl-Sulfoxide. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 119, 958-961.
- , ASCHENBRAND (J. F.) and TODD (R. F.), 1970. — Comparison study of the affectiveness of dimethyl-sulfoxide and polyvinylpyrrolidone in the preservation of human leukemic blood cells at — 80 °C. *Cryobiology*, 6, 409-415.
- BRITTON (S. W.), 1924. — The effects of extreme temperatures on fishes. *Amer. J. of Physiol.*, 67, 411-421.
- CAUJOLLE (F. M. E.), CAUJOLLE (D. H.), CROS (S. B.) and CALVET (M. J. M.), 1967. — Limits of toxic and Teratogenic Tolerance of dimethyl-sulfoxide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, *Biological actions of DMSO*, 141, (1), 110-125. Disc. 126.
- CHATTON (E.) et BLANC (G.), 1951. — Notes et réflexions sur le Toxoplasme et la Toxoplasmose du Gondii (*Toxoplasma gondii*, Nicolle et Manceaux, 1909). *Arch. Inst. Pasteur, Tunis*, 1917, 10, 1-45. *Réimpression Inst. Pasteur Maroc*, 4, 245-290.
- CROS (S.), VOISIN (M. C.), TOLLON (Y.) et OREGLIA (J.), 1970. — Atteinte des bourgeons de membres d'embryons de poulet par le diméthyl-sulfoxyde. *Ann. Pharm. Franç.*, 28, 263-270.

- DESCHIENS (R.) et MOLINARI (V.), 1963. — Le comportement des trypanosomes aux basses températures. *Ann. Soc. Belge Méd., Trop.*, 5, 811-820.
- DESMONTS (G.). — Diagnostic sérologique de la toxoplasmose. Cours d'immunologie générale et de sérologie de l'Institut Pasteur, publié sous la direction de STAUB (A. M.) et RAYNAUD (M.). 2^e éd., Fasc. VII, 1021-1041.
- , 1971. — Une découverte importante : le cycle naturel du Toxoplasme. *Presse médicale*, 79, 471-474.
- DISTEFANO (V.) and KLAHN (J. J.), 1965. — Observations on the Pharmacology and Hemolytic Activity of dimethyl-sulfoxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 7, 660-665.
- DUBEY (J. P.), 1967. — Studies on *Toxocara cati* larvae infected with *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.*, 14, suppl. 42.
- , MILLER (N. L.) and FRENKEL (J. K.), 1970. — The *Toxoplasma gondii* Oocyst from cat feces. *Journ. Exp. Med.*, 132, 636-662.
- , MILLER (N. L.) and FRENKEL (J. K.), 1970. — Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasit.*, 56, 447-456.
- EYLES (DON. E.), COLEMAN (N.) and CAVANAUGH (D. J.), 1956. — Preservation of *Toxoplasma gondii* by freezing. *J. Parasit.*, (4), 42, 408-413.
- FARKAS (A. V.) and GÖBEL (M.), 1969. — Effect of dimethyl-sulfoxide on barley and yeast glucose-6 phosphate deshydrogenase. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sc. Hung.*, 4, 161-171.
- FARRANT (J.), 1965. — Mechanism of cell damage during freezing thawing and its prevention. *Nature*, 205, 1284-1287.
- FRANZ (T. J.) and van BRUGGEN (J. F.), 1967. — A possible Mechanism of Action of DMSO. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 141, 302-309.
- FRENKEL (J. K.), DUBEY (J. P.) and MILLER (N. L.), 1969. — *Toxoplasma gondii* Fecal Forms Separated from Eggs of the Nematode *Toxocara cati*. *Science*, 164, 432-433.
- , —, and —, 1970. — *Toxoplasma gondii* in Cats. Fecal Stages Identified as Coccidian Oocysts. *Science*, 167, 893-896.
- FULTON (J. D.) and SMITH (A. U.), 1953. — Preservation of *Entamoeba histolytica* at — 79 °C in the presence glycerol. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 47, 240-246.
- GARNHAM (P. C. C.), BAKER (J. R.) and BIRD (R. G.), 1962 a. — Fine structure of cystic form of *Toxoplasma gondii*. *Brit. Med. J.*, 5271, 83-84.
- , 1966. — Locomotion in the parasitic protozoa. *Biol. Rev.*, 41, 561-586.
- GIROUD (P.), LE GAC (P.), ROGER (F.) et GAILLARD (J. A.), 1953. — La toxoplasmose de l'adulte. *Sem. des Hôpitaux*, 77, 4036.
- GREENE (A.), BALU (H. A.), LEHR (H. B.) and CORIEIL (L. L.), 1970. — The effect of prolonged storage of cell cultures in dimethyl sulfoxide and glycerol prior to freezing. *Cryobiology*, 6, 552-555.
- GUSTAFSSON (P. V.), AGAR (H. D.) and CRAMER (D. I.), 1954. — An electron microscope study of « *Toxoplasma* ». *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 3, 1008-1021.
- HAGEMAN (R. F.), 1969. — Effect of dimethyl-sulfoxide on RNA synthesis in S. 180 tumor cells. *Experientia*, 25, 1298-1300.

- HIEMISCH (I.), 1970. — Erfahrungen mit der lokalen Anwendung eines in dimethyl-sulfoxyd (DMSO) incorporierten Antimycoticums) bei Onycho-Mykosen. *Mykosen*, 13, 175-177.
- HONIGBERG (B. M.), BALAMUTH (W.), BOVEE (E. C.), CORLISS (J. O.), GOJDICS (M.), HALL (R. P.), KUDO (R. R.), LEVINE (N. D.), LOEBLICH (A. R. Jr), WEISER (J.) and WENRICH (D. H.), 1964. — A revised classification of the phylum Protozoa. *J. Protozool.*, 11, 7-20.
- HUTCHISON (W. M.), 1965. — Experimental Transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature*, 206, 961-962.
- , 1967. — The nematode transmission of *Toxoplasma gondii*. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 61, 80-89.
- , DUNACHIE (J. F.), SIIM (J. Ch.) and WORK (K.), 1970. — Coccidian-like. Nature of *Toxoplasma gondii*. *Brit. Med. J.*, 1, 142-144.
- , DUNACHIE (J. F.) and WORK (K.), 1968. — The faecal transmission of *Toxoplasma gondii*. *Acta path. microbiol. scandinav.*, 74, 462-464.
- , and WORK (K.), 1969. — Observations on the faecal transmission of *Toxoplasma gondii*. *Acta path. microbiol., Scand.*, 77, 275-282.
- JACOBS (L.), 1967. — *Toxoplasma* and Toxoplasmosis. *Adv. Parasitol.*, 5, 1-45.
- , JONES (F. E.) and MELTON (M. L.), 1952. — The survival of *Toxoplasma gondii* in various suspending media. *J. Parasit.*, 38, 293-297.
- JADIN (J. M.) et CREEMERS (J.), 1968. — Etude de l'ultrastructure et de la biologie de *Toxoplasma gondii* (Nicolle et Manceaux, 1908). *Louvain Méd.*, 87, 361-375.
- , —, 1968. — Ultrastructure et biologie des Toxoplasmes III. Observations de Toxoplasmes intra-érythrocytaires chez un Mammifère. *Acta tropica*, 25, 267-270.
- J.A.M.A., 1965. — Editorials. The story of DMSO. *Jama*, 192, 320-321,
- KASS (E.), 1955. — The viability of *toxoplasma* in mouse carcass. *Acta Path. microbiol. scand.*, 37, 84-88.
- KIKKAWA (Y.) and GUEPT (B.), 1964. — *Toxoplasma* cysts in the human heart an electron microscopi study. *J. Parasit.*, 50, 217-225.
- KOBAYASHI (A.) et JACOBS (L.), 1963. — The effect of irradiation on « *Toxoplasma gondii* ». *J. Parasit.*, 49, 814-818.
- LALONDE (E. R.), 1969. — Absorption through oral mucous membranes. *J. Dent. Res.*, 48, 680-684.
- LAVERAN (A.) et MESNIL (F.), 1899. — Sur la morphologie des Sarcosporidies. *C.R. Soc. Microbiol.*, 6, n° 10, 245-248.
- LEAKE (Ch. D.), 1967. — Introductory Remarks. *Ann. N.Y. Ac. Sc., Biological actions of DMSO*, 141, 1, 1-2.
- LEAKE (Ch. D.), ROSENBAUM (E. E.) and STANLEY (W. J.), 1967. — Summary of the New York Academy of Sciences Symposium on the « Biological Actions of dimethyl-sulfoxide ». *Biological actions of DMSO. Ann. N.Y. Ac. Sc.*, 141, 1, 670-671,
- LEE (D.), 1970. — The relative Permeability of Lysosomes from *Tetrahymena pyriformis* to carbohydrates, lactate and the cryoprotective none lectrolytes glycerol and dimethyl-sulfoxide. *Biochem. Biophys. Acta.*, 211, 550-554.

- DE LEIRIS (J.), FEUVRAY (D.), DIACONO (J.) et DIETRICH (J.), 1969. — Action du diméthylsulfoxyde (DMSO) sur le cœur isolé et perfusé du rat. *J. Physiol.* (Paris), suppl. 2, 2, 338-339.
- LELONG (M.) et DESMONTS (G.), 1951. — L'emploi du microscope contraste de phase dans la réaction de Sabin et Feldman. *C.R. Soc. Biol.*, 145, 1660-1661.
- LEVINE (N. D.) 1961. — Problems in the Systematics of the « *Sporozoa* ». *J. Protozool.*, 8, 442-451.
- and MARQUARDT (W. C.), 1954. — The effect of glycerol on survival of *Trichomonas foetus* at freezing temperatures. *J. Protozool.*, 1, suppl. 4, 4-16.
- LOVELOCK (T. E.) and BISHOP (M. W. H.), 1959. — Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl-sulfoxide. *Nature*, 183, 1394-1395.
- LUDVIK (J.), 1958. — Morphology of *Toxoplasma gondii* in electron microscope. *Acta Soc. Zool. Bo hemealovenic. Svazen., Cislo.*, 2, 130-136.
- , 1959. — Die Silberfivillenstruktur bei *Toxoplasma gondii* und *Sarcocystis tenella*. *Z. Parasitenk.*, 19, 311-314.
- LUND (E.), LYCKE (E.) and SOURANDER (P.), 1961. — Studies of « *Toxoplasma gondii* » in cells cultures by means of irradiation experiments. *Brit. J. Exp. Path.*, 42, 404-407.
- LUYET (B. J.), 1938. — Sur la survie des poissons plongés dans l'air liquide. *C.R. Soc. Biol.*, 127, 788-790.
- LUYET (B. J.) and HODAPP (E. J.), 1938. — Sur les noyaux cristallins dans un tissu végétal préalablement chauffé ou gelé. *C.R. Soc. Biol.*, 127, 788-790.
- and —, 1938. — Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 39, 433-434.
- , On the mechanism of growth of ice crystals in aqueous solutions and on the effect of rapid cooling in hindering crystallization, in *Recent research in freezing and drying*.
- LUYET (B. J.) and GEHENIO (P. M.), 1940. — Life and death at low temperatures. *Monograph. Normandy M.W.A. Biodynamica Press*.
- et GONZALES (F.), 1952. — Protective action of glycerol against freezing injury in embryonic tissues of chick. *Biodynamica*, 7, 101.
- et THOENNES (G.), 1938. — The survival of plant cells immersed in liquid air. *Sciences.*, 88, 284-285.
- MC CORD (J. M.) and FRIDOVICH (I.), 1969. — The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, DMSO and oxygen. *J. Biol. Chem.*, 244, 6056-63.
- MC ENTGART (M. G.), 1954. — The maintenance of stock strains of trichomonads by freezing. *J. Hyg. Cambridge*, 52, 545.
- , 1959. — Prolonged survival of *Trichomonas vaginalis* at — 79 °C. *Nature*, 183, 270-271.
- MC FARLANE (J. O.), RUCHMAN (I.), 1948. — Cultivation of *Toxoplasma* in the Developing chick Embryo. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 67, 1-4.
- MAC GREGOR (W. S.), 1967. — The chemical and Physical Properties of DMSO. Biological actions of DMSO. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 141, 3.
- MALININ (Th. I.) and PERRY (V. P.), 1967. — Toxicity of dimethyl-sulfoxide on Hela Cells. *Cryobiology*, 4, 90-96.

- MANWELL (R. D.), COULSTON (F.), BINCKLEY (E. C.) and JONES (V. P.), 1945. — Mammalian and avian *Toxoplasma*. *J. Inf., Dis.*, 76, 1-14.
- and DROBECK (H. P.), 1952. — Mammalian Toxoplasmosis in Birds. *Exp. Parasit.*, 1, 83-93.
- , —, 1953. — The behaviour of *Toxoplasma* with notes on its taxonomic status. *J. Parasit.*, (39), 6, 577-584.
- and EDGEIT (R.), 1943. — The low-temperature freezing of malaria parasites. *Amer. Jour. Trop. Med.*, 23, 123-131.
- MANWELL (R. D.) and JEFFERY (G.), 1942. — Preservation of avian malaria parasites by low temperature freezing. *Proc. Soc. Exp. Biol., and Med.*, 50, 222-224.
- MAZUR (P.), 1960. — Physical factors implicated in the death of micro-organisms at subzero temperatures. *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 85, 610-629.
- MAZUR (P.), 1962. — Mechanisms of injury in frozen and frozen dried cells. *Spec. Cong. Coll. Ottawa*, 55-68.
- MEYER (H.), and DE ANDRADE MENDONCA (I.), 1955. — Electron microscopic observations of *Toxoplasma* « Nicolle et Manceaux » grown in tissue cultures (first note). *Parasitology*, 45, 449-451.
- MIDDLETON (Ch. J.), HOWES (E. L.) and MAZENS (M. F.), 1970. — Effects of dimethyl-sulfoxide on normal and burned dog skin. *Proc. Soc. Exp., Biol. Med.*, 134, 1096-1103.
- NICOLAU (S.) et RAVELO (A.), 1937. — La réaction de fixation du complément dans le sérum et les extraits d'organes d'animaux atteints de toxoplasmose expérimentale. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 30, 855-859.
- NICOLLE (Ch.), 1930. — Naissance, vie et mort des maladies infectieuses, Nouvelle coll. Scientifique, Félix Alcan, édit.
- , 1961. — Destin des maladies infectieuses suivi de l'expérimentation dans l'Etude des maladies infectieuses. Les classiques de la Médecine. Guilde internationale des Médecins. Alliance culturelle du Livre. Genève-Paris-Bruxelles.
- et MANCEAUX (L.), 1908. — Sur une infection à corps leishmann (ou organisme voisin) du gondii. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 147, 763-766.
- et —, 1909. — Sur un protozoaire nouveau du gondii (*Toxoplasma N.Gen.*). *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 148, 639.
- NORBY (R.) and LYCKE (E.), 1967. — Factor enhancing the host cell penetration of *Toxoplasma gondii*. *J. Bacteriol.*, 93, 53-58.
- NORRED (W. P.), ANSEL (H. C.), ROTH (I. L.) and PEIFER (J. J.), 1970. — Mechanism of dimethyl-sulfoxide induced hemolysis. *J. Pharm. Sci.*, 59, 618-622.
- OLISA (E. G.), 1963. — The fine structure of reproducing « *Toxoplasma gondii* ». *Parasitology*, 53, 643-649.
- O.M.S., 1969. — La Toxoplasmose. *Org. Mond. Santé. Sér. Rapp. Techn.*, 431, 27-29.
- PARKES (A. S.), 1945. — Preservation of human spermatozoa at low temperatures. *Brit. Med. J.*, 2, 212.
- and SMITH (A. U.), 1952-1953. — Regeneration of rat ovarian tissue fed-after exposure to low temperatures. *Proc. Roy. Soc.*, 140, 455.
- and —, 1954. — Preservation of ovarian tissue at — 79 °C for transplantation. *Acta Endocrinol.*, 17, 313.

- , 1958. — Factors affecting the viability of frozen ovarian tissue. *J. Endocrinol.*, 17, 337.
- and SMITH (A. V.), 1960. — Recent research in freezing and drying. (Ed. Parkes), 1 vol., 320, Blackwell-Oxford publ., 304.
- PICTET (R.), 1893. — De l'emploi méthodique des basses températures en biologie. *Arch. Sci., Phys. et Nat.*, 30, 293.
- POLGE (C.), 1951. — Functional Survival of Focal Spermatozoon after Freezing at -79°C . *Nature* (Lond.), 167, 949-950.
- and ROWSON (L. E. A.), 1952. — Fertilizing Capacity of Bull Spermatozoa after Freezing at -79°C . *Nature* (Lond.), 169, 626-627.
- , SMITH (A. V.) and PARKES (A. S.), 1949. — Revival of spermatozoa after vitrification and deshydration at low temperatures. *Nature* (Lond.), 164, 666.
- and SOLTYS (M. A.), 1957. — Preservation of Trypanosomes in the frozen state. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.*, 51, 519-526.
- and —, 1960. — Protective action of some neutral solutes during the freezing of bull spermatozoa and trypanosomes in Recent Research in freezing and drying by PARKES (A. S.) and SMITH (A. V.), 1, 87-100.
- POUCHET (F.), 1866. — Recherches expérimentales sur la congélation des animaux. *J. Anat. et Physiol.*, 3, 1-36.
- PRIBORD (B.) and NOVAK (R.), 1969. — The relation of the cryoprotective action of dimethylsulfoxide to salt damage to frog sciatic nerves. *Cryobiology*, 6, 126-129.
- RAMMLER (D. H.), 1967. — The effect of DMSO on Several Enzyme Systems. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 141, 291-299.
- et ZAFFARONI (A.), 1967. — Biological Implications of DMSO Based on a Review of Its chemical Properties. Biological Actions of DMSO. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 141, 13-23.
- RAPATZ (G.) and LUYET (B.), 1968. — Combined effects of freezing rates and of various protective agents on the preservation of human erythrocytes. *Cryobiology*, 4, 215-222.
- RESSLER (R.), LERAY (D.) et GOEDVRIEND (J.), 1965. — Conservation de protozoaires particulièrement en culture, à la température de l'azote liquide. *Ann. Soc. belge Med. Trop.*, 45, 665-678.
- ROSEBAUM (E. E.), MERSCHLER (R. J.) et JACOB (S. W.), 1965. — Dimethyl-sulfoxide in Musculoskeletal Disorders. *Jama*, 192, 309-313.
- ROSTAND (J.), 1946. — Glycérine et résistance du sperme aux basses températures. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), 223, 1524-25.
- SABIN (A. B.), 1938. — Isolation of a filtrable, transmissible agent with « neurolytic » properties from toxoplasma-infected tissues. *Science*, 88, (2278), 189-191.
- , 1941. — Toxoplasmic encephalitis in children. *Jama*, 116, 801-807.
- and FELDMAN (H. A.), 1948. — Dyes as microchemical indicators or a new immunity phenomena affecting a protozoon parasite (Toxoplasma). *Science*, 108, 660-663.
- and OLITSKY (P. K.), 1937. — Toxoplasma and obligate intra-cellular parasitism. *Science*, 85, 336-338.
- SCHNURRENBERGER (P. R.), TJALMA (R. A.), WENTWORTH (F. H.) et WENTWORTH (B. B.), 1964. — Association of human reaction to intradermal toxoplasmin with degree of animal contact and rural residence. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 13, 281-286.

- SENAUD (J.), 1967. — Contribution à l'étude des Sarcosporidies et des Toxoplasmes. *Protistologica*, 3 (2), 167-232.
- SHEFFIELD (H. G.) and MELTON (M. L.), 1969. — *Toxoplasma gondii*: Transmission through Feces in Absence of *Toxocara cati* Eggs. *Science*, 164, 431-432.
- SMITH (E. R.), MASON (M. M.) and EPSTEIN (E.), 1969. — The ocular effects of repeated dermal applications of dimethyl-sulfoxide to dogs and monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 170, 364-370.
- SPALLANZANI (L.), 1776. — Opuscles de physique animale et végétale. Traduction de l'italien par SENEBIER. *J. Zool. (Paris)*, 1787, 189-205.
- STENBACK (F.), 1970. — The solvent effect of dimethyl-sulfoxide in experimental skin carcinogenesis. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.*, 48, 63-65.
- STJERNVALL (L.), 1969. — Dimethyl-sulfoxide (DMSO) abolishes the carcinogenprovoked cytoplasmic barrier of Malignant Epidermal Cells. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.*, 47, 253-258.
- STONE (W. B.) and MANWELL (R. D.), 1963. — Viability of the proliferation form of *Toxoplasma* in distilled water. *J. Parasit.*, 49, 1036-1037.
- SURJUS (A.), LAVILLAUREIX (J.) et GRUNER (J. E.), 1963. — L'encéphalite à toxoplasme de la souris. Apparition de structures fibrillaires dans le noyau des neurones et de la glie. *C.R. Soc. Belge, Biol.*, Paris, 157, 1059-1061.
- THIBAULT (Ph.), 1965. — Que penser du DMSO ? *Presse Médicale*, 73, 2678.
- THOMAS (J. A.), 1962. — Exposés actuels de biologie cellulaire. *Masson et C^{ie}*, édit., Paris, 6 (Survie et conservation biologique).
- VAILLES (Cl.), DEBRAY (Ch.), SOUCHARD (M.) et ROZE (C.), 1970. — Action hémolytique du diméthyl-sulfoxyde chez le Rat. Protection partielle par le Sorbitol. *Ann. Pharm. Franç.*, 28, 85-92.
- VAN DEN BERG (L.) and SOLIMAN (F. S.), 1969. — Effect of glycerol and dimethyl-sulfoxide on changes in composition and pH of buffer selt solutions during freezing. *Cryobiology*, 6, 93-97.
- VAN THIEL (P. H.), 1956. — The toxonomic status of « *Toxoplasma gondii* ». *Antonic v. Leenwenbock.*, 22, 248-256.
- VAN DER WAAIF (D.), 1960. — Formation, growth and multiplication of « *Toxoplasma gondii* » cysts in mouse brains. *Acta Leidensia*, 30, 163-180.
- VERMEIL (C.), TUSQUES (J.), SENELARD (R.) et coll., 1965. — Etude au microscope électronique de l'infrastructure des toxonèmes de « *Toxoplasma gondii* », leur modification sous l'action lytique des anticorps toxoplasmiques. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), 261, 1384-1387.
- VIVIER (E.) et PETIPREZ (A.), 1969. — Le complexe membranaire superficiel et son évolution lors de l'élaboration des individus-fils chez *Toxoplasma gondii*. *J. of cell. Biol.*, 43, 329-343.
- VOGIN (E. E.), CARSON (S.), CANNON (G.), LINEGAR (Ch.) and RUBIN (L. F.), 1970. — Chronic Toxicity of DMSO in Primates. *Toxic Appl. Pharmacol.*, 16, 606-612.
- VUOPALA (U.), ISOMAKI (H.) and KAIPAINEN (W. J.), 1969. — Dimethyl-sulfoxide (DMSO) ointement in the treatment of rheumatoid arthritis. A Double Blind Study. *Acta Rhum. Scand.*, 15, 139-144.

- WALKER (P. J.) and ASHWOOD-SMITH (M. J.), 1961. — Dimethyl-sulfoxide, an alternative to glycerol, for the low-temperature preservation of trypanosomes. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 55, 93-96.
- WANKO (T.), JACOBS (L.) and GAVIN (M. A.), 1962. — Electron microscope study of Toxoplasma cysts in mouse brain. *J. Protozoology*, 9, 235-242.
- WERNER (H.), 1963. — Zur Terminologie der Entwickelungstadien von « Toxoplasma gondii ». *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, 188, 121-131.
- WEIGMANN (R.), 1936. — Zur Kältebeständigkeit poikilothermer Tiere Untersuchung an Schnecken und Fischen. *Biol. Centralbl.*, 58, 301-322.
- WEINMANN (D.) and MC ALLISTER (J.), 1947. — Prolonged storage of human pathogenic protozoa with conservation of virulence: observations on the storage of helminths and leptospira. *Amer. J. Hyg.*, 45, 102-121.
- WIKTOR (I. J.), 1950. — Toxoplasmose animale. Sur une épidémie de lapins et de pigeons à Stanleyville (Congo Belge). *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 50, 97.
- WILDFUHR (G.), 1956. — Experimentelle Versuche zur Resistenz der Toxoplasma. *Z. Hyg. Infektkr.*, 143, 134-139.
- , 1966. — Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie und Reproduktion von « Toxoplasma gondii ». Die feinstruktur von « Toxoplasma gondii » nach Einwirkung I. verschiedener Fixationsmittel (Osmium tetroxyd, Kaliumpermanganat und glutamaldehyd). *Zbl. Bakt., I. Abt., Origis*, 200, 525-535.
- WILLSON (J. E.), BROWN (D. E.) and TIMMENS (E. K.), 1965. — A toxicologic Study of dimethyl-sulfoxide. *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 104-112.
- WOLF (A.), COWEN (D.) and PAIGE (B. H.), 1939. — Toxoplasmosis encephalomyelitis. III. A new case of granulomatous encephalomyelitis due to a protozoan. *Ann. J. Path.*, 15, 657-694.
- , — and —, 1939. — Human toxoplasmosis. Occurrence in infants as an encephalomyelitis. Verification by transmission to animals. *Science*, 89, 2306-226-227.
- WOOD (D. C.), WEBER (F. S.), LARSEN (J. B.) and SMITH (J. C.), 1970. — Some experimental studies with dimethyl-sulfoxide (DMSO) in cold injury. *Curr. Ther. Res.*, 12, 97-110.
- WORK (K.) and HUTCHISON (W. M.), 1969. — Brief Report. A new cystic form of Toxoplasma gondii. *Acta path. microbiol. scandinav.*, 75, 191-192.
- and —, 1969. — The new cyst of Toxoplasma gondii. *Acta path. microbiol. scand.*, 77, 414-424.
-

ANNALES
DE
PARASITOLOGIE

HUMAINE & COMPAREE

Périodique fondé en 1923 par

Emile BRUMPT,

M. LANGERON et M. NEVEU-LEMAIRE

Directeurs :

Henri GALLIARD et Lucien BRUMPT

Secrétaire général :

Mlle Alice BUTTNER

MASSON & C^{ie} EDITEURS

120, Boulevard Saint-Germain, PARIS, 6^e

Tél. 326-56-11 - C.C.P. N° 599 - Paris